



Ana Carolina Martins Reis

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de um Método Analítico de quantificação de
compostos relacionados na análise de um Medicamento
com ação cardiovascular**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Engenheira Clárisse Lourenço dos Santos Penedo,
Diretora do Laboratórios de Ensaios, Tecnimede S.A

Co-Orientador: Professor Doutor Mário Fernando José
Eusébio, Professor Auxiliar na Faculdade de Ciências e
Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Professor Doutor Pedro Miguel Calado Simões
Arguente: Professora Doutora Elvira Maria Mendes Monteiro Gaspar
Vogal: Engenheira Clárisse Lourenço dos Santos Penedo



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

“Validação de um Método Analítico de quantificação de compostos relacionados na análise de um Medicamento com ação cardiovascular” *Copyright* ©, Ana Carolina Martins Reis FCT NOVA

Indicação dos direitos de cópia

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

***Copyright* ©**

Faculdade de Ciências e Tecnologia and Universidade Nova de Lisboa have the perpetual right with no geographical boundaries, to archive and publish this dissertation through printed copies reproduced on paper or digital form or by any means known or to be invented, and to divulge through scientific repositories and admit your copy and distribution for educational purposes or research, not commercial, as long as the credit is given to the author and editor.

Agradecimentos

Após a conclusão deste relatório, quero mostrar o meu agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

Assim sendo, quero agradecer ao Dr. João Serra pela oportunidade de realizar esta dissertação no Grupo Tecnimede.

Aos meus orientadores, Engenheira Clarisse Penedo pela orientação e disponibilidade sempre demonstrada em esclarecer todas dúvidas, e Professor Mário Eusébio pelos conselhos prestados durante a realização da tese.

Aos colegas do Laboratório de Ensaios pela vossa amizade, apoio, disponibilidade e partilha de conhecimentos, foram fundamentais para a minha evolução enquanto profissional. Em especial à minha colega e companheira de estágio Daniela Meira, por ter embarcado ao mesmo tempo nesta nova etapa tendo sido um grande apoio, e à Diana Parreira que esteve sempre disponível com a sua amizade e conhecimento durante os últimos meses.

E por fim, mas não menos importante, o meu afeto especial vai para o apoio dado pelos meus pais e irmão que, não só nestes últimos seis meses, mas durante os cinco anos de curso foram incansáveis.

A todos, muito obrigada!

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo a validação de um método analítico de identificação e quantificação de compostos relacionados na análise de um medicamento de ação cardiovascular. Para isto, teve-se em consideração os pressupostos definidos pela Farmacopeia Europeia e Americana, seguindo as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH).

No processo de validação recorreu-se à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que apresenta atualmente um elevado potencial analítico, cobrindo uma vasta gama de aplicações. Os analitos em estudo foram identificados e separados utilizando uma coluna em fase reversa, uma fase móvel composta por tampão fosfato de amónia a pH 5,0, acetonitrilo e tetrahydrofurano em gradiente, fluxo a 1,8 mL/min e uma deteção por espectrofotometria ultravioleta (UV) a um comprimento de onda de 254 nm.

Após comprovação experimental, o método demonstrou ser adequado, específico sendo necessário ter especial atenção à Impureza H. Na utilização do método validado, a Impureza H deve ser preparada e injetada de imediato de forma a minimizar a interconversão desta com a substância ativa.

O método provou também ser exato, preciso nos parâmetros para os quais foi avaliado (repetibilidade e precisão intermédia), linear, robusto e ainda adequado como indicador de estabilidade.

Palavras-Chave: Garantia da Qualidade, Validação de um Método Analítico, HPLC, Compostos Relacionados.

Abstract

The main goal of this study is the validation of an analytical method of identification and quantification of compounds related in the analysis of a cardiovascular action drug. For this, it were considered the rules defined by the American and European Pharmacopeia and followed the International Conference on Harmonization's (ICH) guidelines.

In order to perform the method's validation it was used high pressure liquid chromatography (HPLC), that nowadays provides with a high level of analytic precision as well as covering a vast range of applications. The analytics considered in this study were identified and separated using a column in reverse phase with a mobile phase composed of a tampon solution of ammonia phosphate at a 5,0 pH, acetonitrile and tetrahydrofuran in gradient, with a flux of 1,8 mL/min and a detection by ultraviolet (UV) spectroscopy at a wave length of 254 nm.

After experimental confirmation, the method proved to be adequate and specific. Nevertheless, it is necessary to pay special attention to the impurity H. In this method, the impurity H must be prepared and injected as fast as possible to prevent it's interconversion with the active substance.

The method also proved to be exact, precise within the parameters in which it was evaluated (repeatability and intermediate precision), robust and also a good stability indicator.

Keywords: Quality Control, Validation of an Analytical Method, HPLC, Related Compounds.

Abreviaturas/siglas

A

ACN (Acetonitrilo)

AIMs (Autorização de Introdução ao Mercado)

API (*Active Pharmaceutical Ingredients*)

D

DAD (*Diode Array Detector*)

H

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

HR (Humidade Relativa)

I

I&D (Investigação e Desenvolvimento)

IC_{95%} (Intervalo de Confiança a 95%)

ICH (*International Conference on Harmonization*)

INFARMED (Autoridade Nacional da Farmácia e do Medicamento)

IPAC (Instituto Português de Acreditação)

IR (Índice de Refração)

L

LC (*Liquid Chromatography*)

LD (Limite de Detecção)

LQ (Limite de Quantificação)

M

MeOH (Metanol)

P

PTFE (Politetrafluoretileno)

R

RSD (*Relative Standard Deviation*)

S

SD (*Standard Deviation*)

S/N (*Signal to noise*)

T

THF (Tetrahidrofurano)

U

UV (Ultravioleta)

Índice

1	Enquadramento	1
2	Introdução.....	3
2.1	Técnicas de Separação cromatográfica.....	3
2.2	Cromatografia Líquida.....	3
2.3	Constituintes de um sistema de HPLC	6
2.4	Validação de um Método Analítico	12
2.5	Caso em estudo	23
3	Materiais e Métodos	27
3.1	Condições Cromatográficas	27
3.2	Preparação de soluções	28
4	Discussão dos resultados obtidos	31
4.1	Adequabilidade do Sistema Cromatográfico	31
4.2	Especificidade	31
4.3	Exatidão	36
4.4	Linearidade	38
4.5	Limite de Detecção	43
4.1	Limite de Quantificação.....	45
4.2	Precisão	47
4.3	Robustez.....	50
4.1	Adequabilidade de um método como indicador de estabilidade	54
5	Conclusões e Propostas de Trabalho Futuro	59
	Referências Bibliográficas	61
	Anexos.....	i
	Anexo A: Cromatogramas relativos à Impureza H.....	i
	Anexo B: Cromatogramas do ensaio de degradações do Produto Acabado	ii
	Anexo C: Cromatogramas do ensaio de degradações da Matéria Prima	xv

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Representação cromatográfica da separação de duas substâncias [5].	4
Figura 2.2 - Representação cromatográfica da separação de duas substâncias	4
Figura 2.3 - Cromatograma de duas substâncias onde não foi alcançada a separação [5].	6
Figura 2.4 - Curvas de Van Deemter para colunas com diferentes tamanhos de partículas de enchimento [36].	8
Figura 2.5 - Esquema do funcionamento de um HPLC [37].	11
Figura 2.6 - Representação cromatográfica da razão sinal-ruído	18
Figura 4.1 - Cromatograma do ensaio da especificidade relativamente à Solução Padrão	32
Figura 4.2 - Cromatograma do ensaio de Especificidade relativamente à Solução Amostra	33
Figura 4.3 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente à solução Placebo	33
Figura 4.4 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente à solução Impureza A	33
Figura 4.5 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente à solução Impureza H	34
Figura 4.6 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente ao Eluente A	34
Figura 4.7 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente à solução fortificada com impurezas	34
Figura 4.8 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente ao Diluente	35
Figura 4.9 - Regressão Linear da Substância Ativa a C=0.2%	39
Figura 4.10 - Resíduos da regressão linear da Substância Ativa a C=0.2%	39
Figura 4.11 - Regressão Linear da Substância Ativa a C=0.25%	40
Figura 4.12 - Resíduos da regressão linear da Substância Ativa a C=0.25%	40
Figura 4.13 - Regressão linear da Impureza A	41
Figura 4.14 - Resíduos da regressão linear da Impureza A	41
Figura 4.15 - Regressão linear da Impureza H	42
Figura 4.16 - Resíduos da regressão linear da Impureza H	42
Figura 4.17 - Cromatograma obtido para o Limite de Detecção da Impureza H	44
Figura 4.18 - Cromatograma obtido para o Limite de Detecção da Impureza A e Substância Ativa a C=0.2%	45
Figura 4.19 - Cromatograma obtido para o Limite de Quantificação da Impureza H	46
Figura 4.20 - Cromatograma obtido para os Limites de Quantificação da Impureza A e Substância Ativa a C=0.25%	46
Figura 4.21 - Exemplo de um espectro de absorvância obtidos para o pico da substância ativa	56
Figura 4.22 - Gráfico representativo da pureza do pico e representação tridimensional do mesmo	57

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Impurezas utilizadas na validação do método analítico	27
Tabela 3.2 - Condições cromatográficas descritas no método a validar	27
Tabela 3.3 - Proporção do gradiente da Fase Móvel	28
Tabela 4.1 - Resultados do estudo da Adequabilidade do Sistema Cromatográfico	31
Tabela 4.2 - Resultado do estudo da Especificidade	32
Tabela 4.3 - Resultados do estudo da exatidão do ativo a C=0,2%	36
Tabela 4.4 - Resultados do estudo da exatidão do ativo a C=0,25%	37
Tabela 4.5 - Resultados do estudo da exatidão da Impureza A	37
Tabela 4.6 - Resultados do estudo da exatidão da Impureza H	37
Tabela 4.7 - Resultados do estudo da exatidão do Ativo, Impureza A e H à concentração do Limite de Quantificação	38
Tabela 4.8 - Resultados do estudo da linearidade do ativo à C=0,2%	39
Tabela 4.9 - Resultados do estudo da linearidade da Substância Ativa a C=0,25%	40
Tabela 4.10 - Resultados do estudo da linearidade da Impureza A	41
Tabela 4.11 - Resultados do estudo da linearidade da Impureza H	42
Tabela 4.12 - Resultados do Fator de Resposta a partir do declive das retas da Linearidade	43
Tabela 4.13 - Concentração mínima verificada para os Limites de Detecção	44
Tabela 4.14 - Resultados do estudo dos Limites de Detecção	44
Tabela 4.15 - Concentração mínima verificada para os Limites de Quantificação	45
Tabela 4.16 - Resultados do estudo dos Limites de Quantificação	46
Tabela 4.17 - Resultados do estudo da Repetibilidade do Sistema	47
Tabela 4.18 - Resultados do estudo da Repetibilidade do Sistema	48
Tabela 4.19 - Resultados do estudo da precisão intermédia do método da Substância Ativa a C=0.2% e C=0.25%	49
Tabela 4.20 - Resultados do estudo da precisão intermédia do método da Impureza A e H	49
Tabela 4.21 - Resultados do estudo da Robustez da Substância Ativa a C=0,2%	50
Tabela 4.22 - Resultados do estudo da Robustez da Substância Ativa a C=0,25%	51
Tabela 4.23 - Resultados do ensaio da Robustez da Impureza A	52
Tabela 4.24 - Resultados do estudo da Robustez da Impureza H	53
Tabela 4.25 - Estabilidade intra-diária do padrão	54
Tabela 4.26 - Fotoestabilidade do produto acabado	54
Tabela 4.27 - Fotoestabilidade da matéria prima	55
Tabela 4.28 - Resumo das degradações térmicas, ácidas, básicas e oxidativas do produto acabado	55
Tabela 4.29 - Resumo das degradações térmicas, ácidas, básicas e oxidativas da matéria prima	55

1 Enquadramento

O colesterol corresponde a uma substância lipídica que circula no sangue, no qual quando presente em condições elevadas, a longo prazo, pode originar uma série de complicações a nível cardíaco, representando uma das causas mais comuns de mortalidade, estimando cerca de 31% das mortes em todo mundo [1,2].

Nesse sentido, o estudo de moléculas de ação cardiovascular é imprescindível para a prevenção de riscos na saúde humana, representando o maior avanço terapêutico na doença coronária das últimas décadas.

A indústria farmacêutica desenvolve um papel importante nas terapêuticas desta área, oferecendo uma vasta gama de produtos para tal, desde medicamentos de referência e medicamentos genéricos.

Como empresa de genéricos em Portugal, surge o Grupo Tecnimede que, fundado em 1980, é uma empresa que apresenta 100% de capital português privado e tem como principal estratégia, o investimento na investigação, desenvolvimento e produção de fármacos.

A forte aposta nos programas de investigação e desenvolvimento, I&D, faz com que o Grupo esteja presente nos lugares cimeiros na lista de empresas portuguesas que mais investem neste tipo de atividades.

Apresentando objetivos como a consolidação no mercado português e o fortalecimento na internacionalização e na exportação, o Grupo viu a sua posição a nível mundial crescer exponencialmente, disponibilizando os seus produtos nos mercados farmacêuticos de todos os continentes.

Desde o início da sua atividade, a Tecnimede apresenta mais de 100 produtos desenvolvidos internamente, gerindo mais de 2500 AIMs¹ [3].

O Grupo segue as Boas Práticas de Fabrico na medida em que estas se aplicam às instalações laboratoriais onde se realizam ensaios destinam a serem submetidos às

¹ AIMs – Autorizações de Introdução no Mercado: Aprovação de medicamentos no mercado

Autoridades Regulamentares, nas diversas fases do ciclo produtivo do medicamento. No caso da Indústria Farmacêutica em Portugal, a entidade responsável pela certificação e regulamentação é o INFARMED, atualmente conhecido como Autoridade Nacional da Farmácia e do Medicamento [4].

Da investigação à produção de fármacos, a Tecnimede apresenta uma série de polos altamente qualificados para a realização deste tipo de atividades. Destacando a área da I&D, o laboratório designado de *Labor Qualitas* tem presente a área de Controlo de Qualidade, o Laboratório de Ensaios, sendo este acreditado pelo Instituto Português de Acreditação, IPAC, seguindo a norma ISO/IEC 17025 [3].

Esta norma foi criada de modo a incorporar todos os requisitos da ISO 9001 no que se refere aos serviços de teste e calibrações, bem como incorporar os requisitos para a competência técnica [4].

▪ Objetivo da dissertação

Nesta dissertação foi validado o método analítico de identificação e quantificação de compostos relacionados na análise de um medicamento com ação cardiovascular, utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, tendo como referência os ensaios descritos nas *guidelines* da ICH – *International Council for Harmonization*, focando na diretriz designada *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*.

2 Introdução

2.1 Técnicas de Separação cromatográfica

A cromatografia é uma técnica de separação de misturas e identificação dos seus constituintes, em que os componentes de uma amostra estão distribuídos entre duas fases, uma das quais corresponde à fase móvel (eluente) e outra corresponde à fase estacionária (adsorvente).

A fase móvel corresponde ao eluente que atravessa a fase estacionária e pode ser de natureza gasosa, líquida ou fluido supercrítico. A fase estacionária, por sua vez, corresponde a um sólido ou líquido depositado num sólido inerte, empacotado numa coluna ou espalhado por uma superfície formando uma camada fina.

A escolha do tipo de cromatografia que melhor se adequa à separação dos componentes incide na composição química dos mesmos. Dentro dos vários tipos de cromatografias existentes, esta monografia foca-se essencialmente na cromatografia líquida, mais propriamente na cromatografia líquida de alta eficiência [5].

2.2 Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida, LC, é uma técnica adequada para a separação dos componentes (espécies iónicas, macromoléculas, entre outros) de soluções líquidas e utiliza-se quer para fins analíticos, preparativos e/ou escala comercial [5].

Deste tipo de cromatografia destaca-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC, sendo cada vez mais utilizada uma vez que apresenta um elevado potencial analítico cobrindo uma vasta gama de aplicações [6].

Quando ocorre a separação dos constituintes por HPLC, obtêm-se um registo designado de cromatograma em que, os diferentes componentes surgem representados através de picos cromatográficos distintos. Os cromatogramas obtidos correspondem a representações de curvas gaussianas numa linha de base (Figura 2.1).

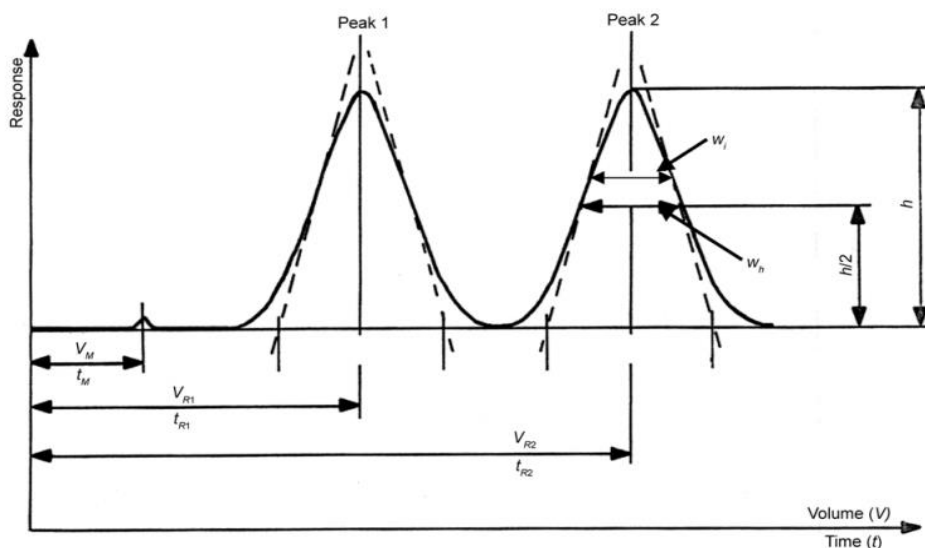


Figura 2.1 - Representação cromatográfica da separação de duas substâncias [5].

A partir destes cromatogramas é possível determinar parâmetros cromatográficos como o tempo de retenção, fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de resolução e razão do pico vale, sendo estes essenciais à análise quantitativa e qualitativa de uma separação.

Tempo de Retenção (t_r)

O tempo de retenção (min) pode ser observado na Figura 2.1 sendo que, em relação à linha de base, corresponde ao tempo que o pico atinge a altura máxima. Este parâmetro exprime a afinidade dos componentes com a fase estacionária, sendo que quanto mais elevado o valor, maior é a afinidade entre ambos.

Através do tempo de retenção e do fluxo da fase móvel, v (mL/min) pode-se determinar o volume de retenção V_r (mL), através da Equação 2.1.

$$V_r = v \times t_r$$

Equação 2.1 - Volume de retenção em função do tempo de retenção e do fluxo

Representadas também na Figura 2.1, encontram-se a largura do pico a meia altura, W_h (min) e a largura do mesmo no momento em que ocorre a inflexão do pico cromatográfico, W_i (min). Estas duas larguras relacionam-se através da Equação 2.2 [4].

$$W_h = 1,18 \times W_i$$

Equação 2.2 - Largura do pico a meia altura

Fator de Retenção (k)

O fator de retenção, k, também conhecido como fator de capacidade é normalmente usado para descrever o rácio de migração de um analito numa coluna cromatográfica e pode ser dado pela Equação 2.3.

$$k = \frac{\text{Quantidade de componente na fase estacionária}}{\text{Quantidade de componente na fase móvel}} \Leftrightarrow k = K_c \frac{V_s}{V_M}$$

Equação 2.3 - Fator de retenção

Nesta equação, K_c corresponde à constante de distribuição e, V_s e V_M correspondem ao volume da fase estacionária e ao volume morto (mL), respetivamente.

O volume morto e o volume da fase estacionária também podem ser determinados experimentalmente ou teoricamente. O V_M representa o volume de um pico não retido, o que corresponde ao volume vazio da coluna cromatográfica, enquanto V_s corresponde ao volume do enchimento da coluna.

Em termos quantitativos, um fator de retenção inferior a 1 exprime uma rápida eluição, e um fator de eluição superior a 1, revela uma eluição mais retardada [7].

Número de pratos teóricos (N)

Aliada aos parâmetros anteriormente descritos, a eficiência da coluna, avaliada pelo número de pratos teóricos, é também um dos aspetos fundamentais da cromatografia. Este é calculado pela Equação 2.4 através da interpretação de um cromatograma combinando o tempo de retenção e a altura do pico a meia altura [4].

$$N = 5.54 \times \left(\frac{t_r}{W_h} \right)^2$$

Equação 2.4 - Número de pratos teóricos

Fator de Resolução (R)

Define-se como Fator de Resolução o grau de separação entre dois analitos distintos presentes no mesmo cromatograma e pode ser calculado a partir da Equação 2.5.

$$R = \frac{1.18 (t_A - t_B)}{W_{0.5A} + W_{0.5B}}$$

Equação 2.5 - Fator de Resolução

Tem-se t_A e t_B como tempo de retenção do analito A e B, respectivamente; $W_{0.5A}$ e $W_{0.5B}$ correspondem à largura do pico a meia altura do analito A e B, respectivamente [5].

Razão do pico-vale

Quando não é possível obter uma boa resolução entre picos, em relação à linha de base dos mesmos, recorre-se à razão do pico/vale (Figura 2.3). Este fenómeno poderá ocorrer quando a diferença de concentrações entre as duas substâncias é bastante significativa.

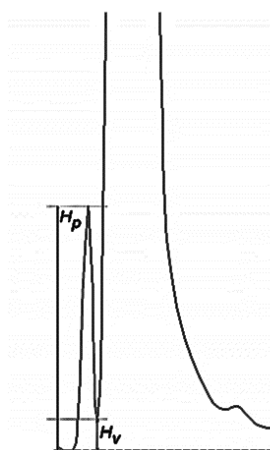


Figura 2.3 - Cromatograma de duas substâncias onde não foi alcançada a separação [5].

Através da Equação 2.6 pode-se calcular este mesmo parâmetro, que matematicamente, corresponde ao rácio entre a altura do pico da impureza, medida do extremo do pico à linha de base extrapolada (h_p), e a distância da linha de base extrapolada ao ponto mais baixo do vale que separa o pico principal do pico da impureza (h_v) [5].

$$p/v = \frac{h_p}{h_v}$$

Equação 2.6 - Razão do pico/vale

2.3 Constituintes de um sistema de HPLC

As propriedades físico-químicas da substância ativa em estudo, como solubilidade, polaridade, pH e pKa, apresentam elevada importância no desenvolvimento de um

método analítico. Estas características afetam a escolha do tipo de coluna cromatográfica, da composição da fase móvel e tipo de detetor [8].

Coluna Cromatográfica

A coluna cromatográfica apresenta-se como o constituinte mais importante, podendo ser apelidada de “coração” do HPLC. A escolha da coluna altera de forma significativa os resultados obtidos durante o desenvolvimento do método analítico [8].

No início da década de 70, época que marca o início das primeiras utilizações da cromatografia líquida de alta eficiência, as partículas que constituíam o enchimento da coluna apresentavam cerca de 10 μm de diâmetro. Com a intenção de melhorar a eficiência das mesmas, o tamanho das partículas tem vindo a diminuir significativamente chegando a um diâmetro de partícula de 1,7 μm . Este aumento de eficiência das colunas leva a um aumento da velocidade linear (cm/s) da fase móvel, que por sua vez origina tempos de retenção do analito mais baixos e consequentemente, tempos de análise cromatográfica mais curtos [9].

A maioria das separações por HPLC utiliza a sílica como suporte da fase estacionária em fase reversa representando cerca de 90% dos casos de separação cromatográfica por coluna, uma vez que, para além de ser um enchimento altamente seletivo e eficiente, realça os seus baixos custos operativos devido ao eluente ser constituído por água, metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) ou tetrahidrofurano (THF) [6].

Uma vez que estes solventes apresentam elevada polaridade, os grupos funcionais correspondentes ao enchimento da coluna apresentam uma polaridade baixa, que promove a ligação de cadeias de hidrocarbonetos (hidrofóbicas) cujas características variam consoante o número de carbonos. Tem-se como fases estacionárias, os grupos Fenil, C2, C4, C8, C18, entre outros, sendo este último o mais utilizado. Quanto mais longa for a cadeia de átomos de carbono mais hidrofóbica é a fase estacionária [6,10].

Para além da variação da hidrofobicidade com a variação do número de carbonos, outros fatores que influenciam a performance de uma coluna são, por exemplo [6]:

- Tamanho e a forma da partícula, estando relacionados com a eficiência e a estabilidade do leito cromatográfico;
- Área superficial (m^2/g) que indica a capacidade de adsorção da fase estacionária;

- Tamanho do poro e a transferência de massa, estando relacionado com a velocidade de separação;
- Química intrínseca da sílica-base, ou seja, pH, conteúdo em metais e condições de manufatura.

Uma forma de avaliar a eficiência do sistema cromatográfico e em particular da coluna cromatográfica, é traçar uma curva que relacione a altura equivalente a um prato teórico (H) em função da velocidade linear da frente do solvente (u). Obtém-se então uma curva $H=f(u)$ com o nome de Curva de Van Deemter, que tem como objetivo avaliar as características do sistema cromatográfico pela alteração, por exemplo, da dimensão da coluna, viscosidade, fase móvel, entre outros fatores [6].

Na Figura 2.4 encontra-se uma representação da Curva de Van Deemter que relaciona a eficiência das colunas com a variação do tamanho das partículas da fase estacionária.

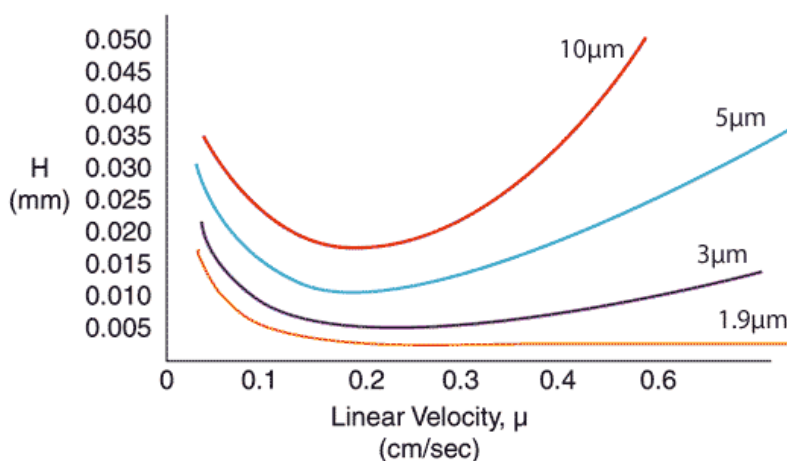


Figura 2.4 - Curvas de Van Deemter para colunas com diferentes tamanhos de partículas de enchimento [36].

A natureza da fase estacionária apresenta consequências no fator de capacidade, seletividade, eficiência e eluição [8].

Fase Móvel

A escolha do solvente constituinte da fase móvel está associado à solubilidade do analito no mesmo, o que afeta a resolução, seletividade e a eficiência [8].

Para além da escolha dos constituintes da fase móvel, é avaliada ainda a utilização do sistema cromatográfico de forma isocrática ou em gradiente.

Num sistema isocrático, as condições cromatográficas da fase móvel são mantidas constantes durante o tempo de corrida, ao contrário de em gradiente, onde a composição da fase móvel varia durante a corrida. A escolha de um sistema isocrático ou gradiente depende do número de analitos a separar.

A cromatografia de fase reversa corresponde à LC mais usada atualmente uma vez que apresenta separações com uma variedade de amostras contendo analitos não-polares, polares ou iônicos de acordo com a hidrofobicidade dos mesmos. Neste tipo de cromatografia são utilizadas soluções tampão aquosas e solventes orgânicos polares miscíveis com a água, devendo as soluções tampão passar por um sistema de filtração de modo a garantir um bom funcionamento do HPLC [10].

Existe também a cromatografia de fase normal que utiliza como solventes para a fase móvel soluções orgânicas não polares como n-Hexano ou Diclorometano. Por outro lado, a cromatografia de fase normal corresponde à LC mais antiga mas menos usada comparativamente com a cromatografia de fase reversa, mas apresenta vantagens tais como a baixa viscosidade dos orgânicos usados, o que leva a uma pressão na coluna inferior à de solventes aquosos; as colunas são mais estáveis em solventes orgânicos do que em solventes aquosos; entre outros [10].

Desgaseificar a fase móvel é importante pois os gases dissolvidos nos solventes podem formar bolhas e interferir com o desempenho das bombas e dos detetores [11].

Detetor

O detetor é provavelmente o segundo componente mais importante de um HPLC, logo após a coluna cromatográfica.

Os detetores de absorvência em UV, índice de refração (IR), fluorescência e de condutividade correspondem a 80% dos detetores usados em separação cromatográfica. Novos tipos de detetores como detetores eletroquímicos ou de espectroscopia de massa (MS) têm sido desenvolvidos para dar resposta a análises com níveis de concentração mais baixos, com a possibilidade de identificação da estrutura de novas moléculas.

O uso de um detetor UV de comprimento de onda fixo para separações cromatográficas líquidas foi descrito pela primeira vez por Horvath e Lipsky em 1966, e corresponde ao detetor de HPLC mais utilizado atualmente. Embora outras técnicas de detecção sejam

mais sensíveis, o detetor UV fornece uma resposta simples e universal à maioria das aplicações em HPLC.

Uns anos mais tarde surgiram os detetores de varrimento mais conhecidos como *Diode Array Detector* (DAD) que vieram revolucionar as separações cromatográficas. Este tipo de detetor mede o espectro de absorção total de cada pico de analito e fornece informações adicionais dos mesmos.

O detetor IR também apresenta uma elevada utilização em HPLC. Embora a sensibilidade seja geralmente inferior à da maioria dos outros detetores de cromatografia líquida, os detetores IR são particularmente úteis para compostos não cromogéneos, como açúcares, polímeros de alto peso molecular e alguns produtos farmacêuticos.

Já em relação aos detetores de fluorescência, estes ganharam popularidade devido à sua elevada sensibilidade, embora a maioria dos analitos não possuam fluorescência natural. O desenvolvimento de procedimentos de derivação utilizados para classificar os analitos separados com um composto fluorescente facilitou a ampla aplicação da detecção de fluorescência [10].

Devido às inúmeras vantagens relacionadas com a diminuição do tamanho interno das colunas e por sua vez, a diminuição do tamanho das partículas constituintes das mesmas, os detetores convencionais tiveram que ser adaptados pois eram inadequados aos picos que eram eluídos das colunas. Com isto, o uso de detetores MS, ressonância magnética nuclear (RMN), entre outros tornaram-se importantes pois são capazes de detetar baixos volumes de injeção, uma consequência do uso de cromatografia líquida capilar [12].

Funcionamento de um HPLC

Na Figura 2.5 é possível observar um esquema de HPLC. Este é constituído por bombas, colunas cromatográficas, detetores e aparelhos aptos a detetar os sinais gerados pelos detetores.

O sistema de bombagem força a fase móvel a percorrer o equipamento, que gera um fluxo específico (mL/min) a elevadas pressões. Este sistema deve ser estável e isento de pulsações de modo a minimizar o ruído de fundo no detetor. Deve ainda ser capaz de ajustar a gama de fluxos de acordo com os vários métodos analíticos (gama ideal entre

0,1 e 5 mL/min), e além disso, deve suportar as altas pressões geradas pelo seu próprio mecanismo e ter a capacidade de se adaptar ao funcionamento de trabalho em gradiente.

Posteriormente, o sistema de injeção transfere as amostras para a fase móvel que as transporta até à coluna cromatográfica. O sistema de injeção mais utilizado corresponde ao sistema de válvula de injeção uma vez que apresenta uma maior repetibilidade no volume injetado e por sua vez melhores resultados em análises quantitativas, ao invés do sistema de injeção direta por seringa [6].

Após a injeção, os diversos constituintes são levados até à coluna onde são diferencialmente separados, uma vez que apresentam diferentes velocidades de migração dependendo da respetiva afinidade com a fase estacionária.

Numa fase final, a amostra passa por um detetor que fornece um sinal potenciométrico (mV), sendo necessário um sistema de tratamento de dados adequado à sua quantificação, de forma a obter uma representação cromatográfica dos picos dos analitos. Os detetores de cromatografia mais utilizados são os de ultravioleta, estando aptos a operar numa vasta gama de comprimentos de onda [6].

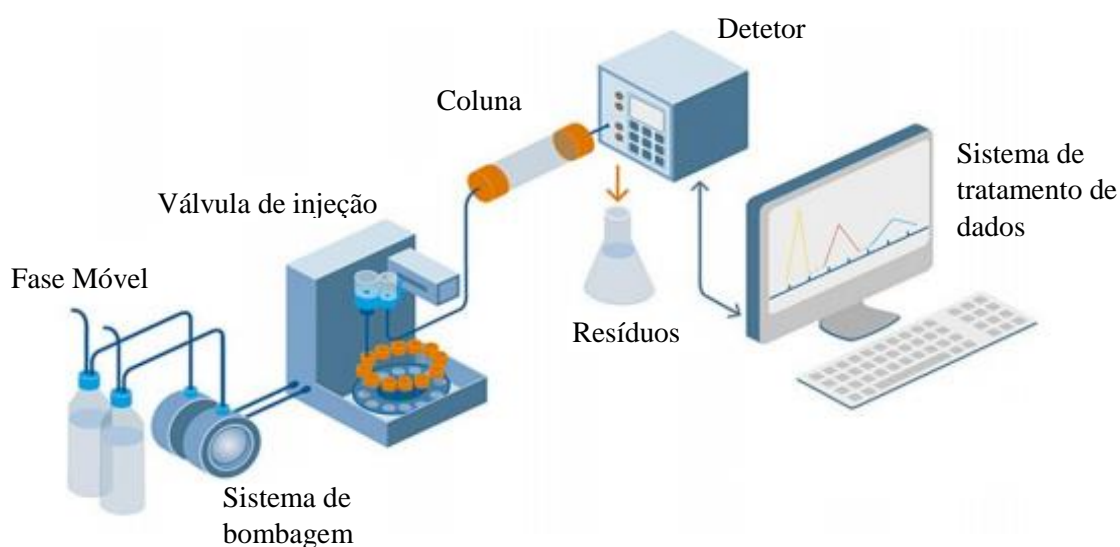


Figura 2.5 - Esquema do funcionamento de um HPLC [37].

2.4 Validação de um Método Analítico

O processo de validação pretende demonstrar que o método é adequado para a quantificação do analito na matriz, a um certo nível de concentração, com exatidão e precisão satisfatórias. É fundamental assegurar a escolha do método que melhor se adequa a cada análise de modo a garantir a validade dos resultados [7].

A validação de um determinado método deve ser demonstrada em laboratório e a preparação e a execução do mesmo deverá seguir um protocolo de validação com instruções passo a passo. Posto isto, para a validação de um método analítico é necessário [13]:

- Desenvolver um protocolo de validação/procedimento de operação;
- Definir qual o objetivo do método a validar;
- Definir os critérios de aceitação;
- Definir os reagentes e materiais a usar;
- Desenvolver um relatório de validação com todos os resultados obtidos.

A grande mais-valia da validação de um método analítico tem por base a confiança no procedimento posto em prática, de forma a eliminar erros e sucessivas repetições do método em análises recorrentes [13].

Este processo é realizado para o doseamento da substância ativa, para compostos relacionados, compostos não ativos e ensaios de dissolução.

No ensaio de doseamento, o objetivo é quantificar a substância ativa presente na amostra. Por sua vez, na análise aos compostos relacionados, são caracterizadas e quantificadas impurezas ou potenciais produtos de degradação da substância ativa, bem como a identificação dos mesmos em ensaio de degradação forçada da matéria prima e produto acabado. Em relação aos ensaios de dissolução, estes têm como objetivo quantificar a quantidade de substância ativa libertada em função do tempo em ensaios *in vitro* [14].

A caracterização de impurezas num fármaco apresenta elevada importância devido aos potenciais efeitos secundários, possíveis toxicidades e impacto na eficácia e estabilidade do fármaco que as mesmas podem ter.

A ICH fornece diretrizes para a identificação e quantificação de impurezas num fármaco em que, qualquer composto que não tenha a mesma identidade química que a substância ativa necessita de ser avaliado. Esta organização corresponde a um Concelho Internacional de Harmonização de requisitos técnicos para produtos farmacêuticos para uso humano, que apresenta como finalidade alcançar uma harmonização mundial de modo a garantir o desenvolvimento e registro de medicamentos seguros, eficazes e de alta qualidade de forma eficiente e eficaz em termos de recursos. A harmonização é conseguida através do desenvolvimento de diretrizes, vulgarmente conhecidas como *guidelines*, através de um processo de consenso científico que envolve o trabalho conjunto de especialistas em regulamentação e indústria [15].

Assim sendo, existe uma constante preocupação em desenvolver novos métodos precisos, seletivos e sensíveis para a determinação de compostos relacionados. Estes compostos podem ser [16]:

- Intermediários ou subprodutos da síntese da API (impurezas relacionadas com o processo);
- Produtos de degradação que se formam durante o processo de fabrico e armazenamento a longo prazo;
- Produtos de interação entre a API e outros componentes ativos e não ativos.

Os parâmetros a avaliar, aquando de uma validação de um método analítico, encontram-se descritos na *ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)* [17].

▪ Adequabilidade do Sistema

A adequabilidade de um sistema cromatográfico refere-se à forma como um pico cromatográfico se encontra adequado aos parâmetros de avaliação a analisar.

Como parâmetros de adequabilidade tem-se o tempo de retenção, que deve ser constante; a razão do pico-vale, que é calculado quando não é possível obter-se uma separação cromatográfica total entre dois picos distintos; e o fator de resolução que mede o grau de separação de dois picos consecutivos separados entre si [18].

▪ Especificidade

A especificidade é a capacidade de diferenciar o analito de outras substâncias eventualmente presentes na matriz amostra a analisar, como solvente, fase móvel, ativo, entre outros [17].

▪ Linearidade

A linearidade de um ensaio corresponde à capacidade de se obter resultados que são diretamente proporcionais ou que descrevem uma transformação matemática bem definida, em função da variação da concentração do analito [19].

Para isto, deve-se realizar a injeção da solução do analito a diferentes concentrações, na gama de trabalho a validar. Aos resultados obtidos é aplicada a correlação do método dos mínimos quadrados, obtendo-se a reta ótima que descreve a relação linear dada por $y=mx+b$, entre os valores de concentração do analito (x) e as respectivas médias das respostas analíticas (y) obtidas para cada concentração [20].

Um dos testes estatísticos mais utilizados não só para a linearidade, mas como também para os restantes parâmetros de validação é o intervalo de confiança. O intervalo de confiança exprime a estimativa por meio de dois valores entre os quais se situará, com uma determinada probabilidade, o verdadeiro valor de um parâmetro θ [21].

Um parâmetro pode ser estimado por um intervalo definido por duas estatísticas, no qual o verdadeiro valor estará contido com um determinado nível de confiança $(1-\alpha)100\%$. Se θ designar o parâmetro em causa, têm de ser definidas duas estatísticas L_I (Limite Inferior) e L_S (Limite Superior) tais que [21]:

$$P\{L_I \leq \theta \leq L_S\} = 1 - \alpha$$

Equação 2.7 - Parâmetro θ definido por duas estatísticas, L_I e L_S

Este intervalo corresponde ao intervalo de confiança a $(1-\alpha)100\%$ para o parâmetro θ , sendo L_I e L_S os limites de confiança. Diz-se intervalo bilateral uma vez que especifica dois limites de confiança.

$$L_I \leq \theta \leq L_S$$

Equação 2.8 - Intervalo de confiança a $(1-\alpha)100\%$ para o parâmetro θ

O intervalo de confiança mais utilizado para os cálculos do IC_{95%} correspondem ao intervalo de confiança da média de uma distribuição normal com variância desconhecida.

$$\bar{X} - t_{\frac{\alpha}{2}, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{X} + t_{\frac{\alpha}{2}, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Equação 2.9 - Intervalos de confiança da média de uma Distribuição Normal com variância desconhecida

Em que $t_{\frac{\alpha}{2}, n-1}$ corresponde ao percentil à direita da distribuição *t-student* com n-1 graus de liberdade em que, no caso da validação em estudo, n corresponde ao número de amostras para a realização de cada ensaio, S ao desvio padrão e α toma o valor de 5%. [21]

▪ Precisão

A precisão pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios que são independentes entre si, na medida em que estes resultados se apresentem concordantes em relação às amostras preparadas a partir de uma amostra homogénea [20,22].

Para isto, é necessário avaliar a repetibilidade do sistema, a repetibilidade do ensaio, precisão intermédia e a reprodutibilidade.

Repetibilidade do Sistema

A repetibilidade do sistema corresponde a uma medida de variabilidade inerente ao sistema cromatográfico. Para o cálculo deste parâmetro é importante obter valores como a média, o desvio padrão (SD) e o desvio padrão relativo (RSD). Para o cálculo do limite de aceitação para o RSD segue-se a Equação 2.10.

$$RSD_{max} = \frac{K \times B \times \sqrt{n}}{t_{90\%, n-1}}$$

Equação 2.10 - Limite de aceitação para o valor de RSD

Em que K corresponde a uma constante de valor 0,349, B representa o limite superior do intervalo definido para o analito menos 100 por cento, n corresponde ao número de

repetições e $t_{90\%, n-1}$ indica a *t-student* ao nível de confiança 90%², para n-1 graus de liberdade [4].

Repetibilidade do método

A repetibilidade do método expressa a sua precisão sob as mesmas condições experimentais, determinada após análise dos resultados de uma série de amostras independentes. Também pode ser designada de precisão intra-ensaio e é avaliada através do RSD entre amostras [17].

Precisão Intermédia

A precisão intermédia também corresponde a um parâmetro avaliado através do RSD e refere-se à precisão avaliada, sobre amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, na medida de avaliar as discrepâncias entre, por exemplo, diferentes operadores, diferentes instrumentos, reagentes de diferentes fornecedores e/ou colunas de diferentes lotes [20,22].

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade expressa a precisão de um ensaio quando este é realizado sob diferentes condições em diferentes laboratórios, sendo que a comparação dos resultados obtidos por diferentes analistas usando diferentes equipamentos e realizada em espaços de tempo distintos pode transmitir informações importantes. No entanto este não é um parâmetro avaliado na presente validação [13].

▪ Exatidão

A exatidão de um método analítico corresponde à proximidade entre os resultados experimentais obtidos e os valores verdadeiros de referência correspondentes [15].

A exatidão pode ser realizada de diversas formas de entre as quais [13]:

- Analisar uma amostra de concentração conhecida e comparar com o seu valor teórico correspondente. Para isto, é necessário a utilização de uma amostra bem caracterizada, como por exemplo, uma solução padrão;

² Para um teste bilateral

- Fortificar uma solução placebo, ou seja, colocar uma quantidade conhecida de substância a analisar na matriz e comparar os resultados obtidos com os resultados expectáveis;
- Fortificar uma solução de produto acabado. Para tal, a amostra é doseada sendo posteriormente fortificada com o componente puro, de quantidade conhecida, ao fim do qual é novamente doseada. A diferença entre os dois doseamentos é comparada com a resposta expectável dessa fortificação.

Tanto na fortificação de uma solução placebo como na fortificação de produto acabado, os resultados obtidos surgem através de uma percentagem de recuperação do analito na matriz [13].

Placebo corresponde a um conjunto que excipientes (componentes inativos) cuja constituição difere da substância ativa. Tem como função atuar como transportador (veículo ou base) da substância ativa, assim como contribuir para a estabilidade, perfil biofarmacêutico, aparência do fármaco, entre outros [23].

A ICH recomenda para este ensaio, a determinação de no mínimo nove amostras, com pelo menos três diferentes níveis de concentração e três repetições entre cada nível [17].

▪ Limite de Detecção

O Limite de Detecção, LD, é descrito como a menor concentração de analito numa amostra em que é possível de ser detetado.

Critério Visual

Quantidade mínima de analito que pode ser detetado a partir de amostras com concentração conhecida.

Razão Sinal-Ruído

A determinação da razão Sinal-Ruído é realizada através da comparação entre amostras de concentrações mínimas de analito conhecidas e amostras de branco³. Pode ser calculado através da Equação 2.11.

³ Amostra de branco corresponde a uma amostra onde os analitos em análise não estão presentes

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

Equação 2.11 - Razão Sinal-Ruído

Nesta equação, H corresponde à altura máxima do pico até à linha de base do sinal, extrapolado por uma distância de pelo menos cinco vezes a largura do pico a meia altura. Por sua vez, h corresponde à diferença entre o menor e maior valor de ruído, extrapolado igualmente por uma distância de pelo menos cinco vezes a meia altura do pico da solução de referência, preferencialmente situado na proximidade do mesmo. Para o LD considera-se uma razão sinal-ruído de 3:1 e a sua representação cromatográfica encontra-se na Figura 2.6 [8].

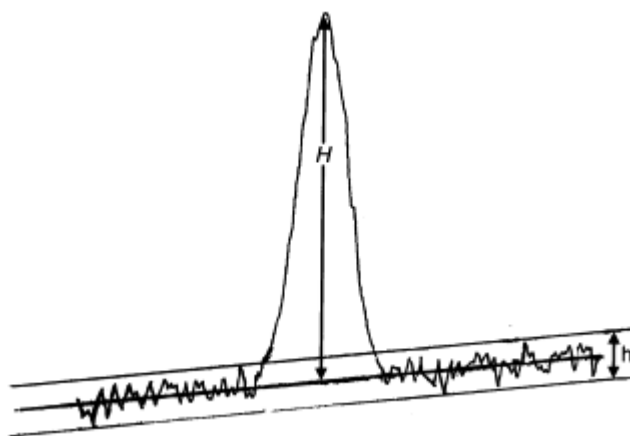


Figura 2.6 - Representação cromatográfica da razão sinal-ruído

Critério Estatístico

O critério estatístico do ensaio de LD pode ser calculado recorrendo à reta obtida no ensaio da Linearidade, em que se relaciona o erro padrão associado à ordenada na origem (σ) com o declive da mesma regressão linear (S). O cálculo para este critério pode ser realizado recorrendo à Equação 2.12.

$$L.D. = \frac{3.3 \times \sigma}{S}$$

Equação 2.12 - Limite de Detecção em relação ao critério estatístico

A medição da resposta analítica é realizada através da análise de um número apropriado de amostras em branco e do cálculo do desvio padrão dessas mesmas respostas [17].

▪ Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação, LQ, é descrito como a menor concentração de analito numa amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão. Este tipo de ensaio é normalmente usado para a determinação de impurezas e para a degradação de produtos [17].

Critério Visual

Nível mínimo de analito que pode ser quantificado a partir de amostras com concentração conhecida.

Razão Sinal-Ruído

Segue o mesmo critério descrito no ensaio para obtenção do LD, considerando-se aceitável uma razão sinal-ruído de 10:1.

Critério Estatístico

O critério estatístico do ensaio de LQ pode ser calculado recorrendo à reta obtida no ensaio da Linearidade, em que se relaciona o erro padrão associado à ordenada na origem (σ) com o declive da mesma regressão linear (S). Este critério pode ser calculado através da Equação 2.13.

$$L. Q. = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

Equação 2.13 - Limite de Quantificação em relação ao critério estatístico

Do mesmo modo do ensaio de LD, a medição da resposta analítica é realizada através da análise de um número apropriado de amostras em branco e do cálculo do desvio padrão dessas mesmas respostas [17].

▪ Robustez

A robustez de um ensaio mede a sensibilidade do mesmo face a ligeiras alterações dos seus parâmetros analíticos. Um método diz-se robusto caso não seja sensível a pequenas variações durante a sua *performance* [22].

Este parâmetro representa a confiabilidade de um procedimento durante o seu uso em rotina. Quanto maior for a sua robustez, maior será a confiança desse relativamente à sua precisão.

De forma a determinar a robustez de um método alteram-se vários parâmetros do mesmo, tais como o fluxo, a temperatura da coluna, o comprimento de onda de detecção ou a composição de fase móvel, entre outros, tendo em conta alterações realistas [20].

A avaliação da robustez deve ser realizada a parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico como por exemplo, a resolução entre picos cromatográficos, de modo a garantir a validade do procedimento analítico quando este é usado em análises recorrentes.

Devem selecionar-se os fatores mais suscetíveis a ligeiras alterações, que poderão surgir aquando da transferência de um método é transferido entre analistas ou instrumentos de análise e que possam influenciar potencialmente as respostas dos analitos ao método [24].

▪ Adequabilidade de um método como indicador de estabilidade

Nos dias de hoje, existem ainda algumas divergências entre indústrias farmacêuticas no que diz respeito às condições de degradação que devem ser executadas durante estes ensaios, nomeadamente qual a concentração que deve ser utilizada nos reagentes de degradação e o tempo de exposição. Contudo é concordante entre entidades a importância dos parâmetros avaliados neste tipo de ensaios, assim como os critérios necessários para considerar um método adequado como indicador de estabilidade e a análise qualitativa dos produtos de degradação [25].

No entanto, a ICH apresenta uma guideline de estabilidade de produtos farmacêuticos designada por *Stability Testing of New Drug Substances and Products*, em que revela a importância da realização de testes sob condições de *stress* de forma a avaliar as características inerentes de estabilidade da substância ativa. Estes testes podem prever o aparecimento de possíveis produtos de degradação obtidos em estudos de estabilidade a longo termo [26,27].

O principal objetivo dos testes sob condições hostis corresponde à deteção da redução do teor de substância ativa e por sua vez, o recíproco surgimento de impurezas e/ou produtos de degradação. Pretende-se que estes potenciais interferentes no teor de substância ativa,

possam ser identificados e quantificados de modo a que, globalmente, o processo demonstre um balanço de massa coerente quando avaliado antes e após a degradação forçada.

É importante comparar resultados dos componentes individuais do ativo, mas também dos outros componentes resultantes da formulação dos medicamentos. Posto isto, as degradações devem ser realizadas ao placebo, produto acabado e matéria prima de modo a perceber por comparação de resultados, a que produtos de degradação correspondem os picos cromatográficos que possam surgir.

Uma das principais questões entre cientistas farmacêuticos assenta na seleção da quantidade de degradação suficiente. Degradações entre 5 a 20% são aceitáveis no ponto de vista da validação de um método. No entanto, nem todos os ensaios de degradação forçada originam estes valores de degradação, o que poderá indicar a estabilidade da molécula.

Conhecer a estabilidade da molécula facilita todo o processo de seleção do tipo de excipiente e da embalagem, bem como as melhores condições de armazenamento do produto e respetiva validade.

Os ensaios de degradação forçada correspondem a ensaios mais severos que os ensaios em condições acelerados.

Tem-se como testes de degradação forçada as hidrólises ácidas, básicas e oxidativas, fotossensibilidade, humidade e temperatura [28].

Hidrólise

A hidrólise corresponde a um processo químico em que ocorre a quebra de ligações químicas através da reação com uma molécula de água.

A escolha do tipo de ácido ou base e sua concentração depende da estabilidade da molécula. Neste tipo de ensaio, o ácido clorídrico (HCl) e o ácido sulfúrico (H₂SO₄) entre 0,1 e 1M para hidrólises ácidas, e o hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH) entre 0,1 e 1M para hidrólises básicas, são os reagentes preferenciais.

No caso da hidrólise oxidativa, a escolha do reagente e sua concentração depende da estrutura molecular da substância ativa. Normalmente utiliza-se um oxidante entre 0,1%

a 3% de concentração, sendo que o reagente mais utilizado é o peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Este tipo de degradações envolve o mecanismo de transferência eletrónica [28].

Degradação Fotolítica

Este tipo de ensaio tem como principal objetivo demonstrar que a exposição solar não apresenta uma elevada degradação da substância ativa. Os produtos são normalmente expostos a luz UV ou a luz fluorescente [28].

Na *guideline* da ICH designada de *Stability testing: Photostability testing of new drug and products (Q1B)* encontram-se algumas condições recomendadas para este tipo de ensaio, tais como a exposição mínima de 1,2 milhões de horas de luz e uma energia UV mínima de 200Wh/m². Estes testes servem para comparar diretamente amostras de matéria prima e produto acabado [29].

Condições de *stress* provocadas através da radiação desencadeiam o processo de fotodegradação pelo mecanismo de radicais livres [28].

Degradação térmica

As condições descritas para o estudo de degradação através de condições térmicas apresentam condições mais hostis em comparação com os estudos de estabilidade a longo termo⁴.

O efeito da temperatura sob a substância ativa é estudado através da equação de Arrhenius,

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Equação 2.14 - Equação de Arrhenius

Em que k corresponde à constante de velocidade específica, A ao fator de frequência, E_a corresponde à Energia de Ativação, R à constante dos gases perfeitos e por fim, T à temperatura [28].

Estes ensaios devem realizar-se num gama de temperaturas entre os 40°C e os 80°C, visto que, para temperaturas superiores a 80°C, o aumento da energia de ativação pode levar a

⁴ Estabilidade a longo termo: Medicamentos sujeitos a condições de 25°C e 60%HR, 30°C e 65%HR, 30°C e 75%HR, ou 40°C e 75%, de forma a simular as zonas climáticas do globo.

que ocorram de reações secundárias o que, por sua vez, poderá originar problemas no balanço de massas ao processo.

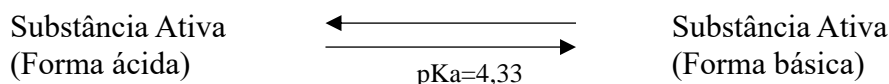
Para os ensaios da adequabilidade do método como indicador de estabilidade, é recomendado recorrer a um sistema de HPLC com detetor de varrimento, mais conhecido como DAD, *Dioxide Array Detector*. Este tipo de detetor permite verificar a pureza dos picos cromatográficos, incluindo o pico da substância ativa, que tem particular interesse.

Neste tipo de ensaios, é importante uma avaliação dos seguintes parâmetros: resolução entre picos, pureza do pico (nomeadamente quando se fala da substância ativa isolada), assimetria e eficiência da coluna [25].

2.5 Caso em estudo

Uma pesquisa exhaustiva na literatura indicou que vários métodos já foram validados de modo quantificar a substância ativa em estudo, individualmente ou em combinação com outras substâncias ativas [16].

O princípio ativo em estudo é administrado na sua forma ácida, sendo convertido na sua forma básica *in vivo* [30].



Esta interconversão pode ocorrer antes da preparação da amostra, durante a preparação da amostra e durante a análise do produto. Com isto, é crucial a otimização de uma série de passos no método analítico de modo a minimizar a interconversão durante a análise [16].

Da validação a métodos analíticos realizados para a substância ativa em causa, verifica-se alguns casos em particulares:

- Caso 1: pH da fase móvel=5,5; Comprimento de onda=240 nm; Composição da fase móvel: K₂PO₄:ACN (65:35); Coluna C18 (100x4,6mm), 2,6µm a 40°C [31];
- Caso 2: pH da fase móvel=4; Composição da fase móvel: ACN: Acetato de amónia (30:70); Coluna C18 (100x2,1mm), 1.7µm a 35°C [32].

A diferença fundamental entre estes dois casos corresponde ao pH da fase móvel e à diferença no tipo de impurezas quantificadas. No caso 1, o pH da fase móvel é ligeiramente superior ao do caso 2 e não ocorreu a validação da Impureza H. No caso 2, o pH é mais ácido e houve a validação da Impureza H. Esta impureza corresponde à forma básica da substância ativa.

Uma vez que ocorre a interconversão da Impureza H no ativo dá-se a pH 4,33, que corresponde ao pKa desta impureza, é importante ter em atenção ao desenvolvimento do método analítico para este tipo de caso. Numa primeira fase, é necessário escolher as condições de modo a minimizar a interconversão e numa segunda fase, escolher a composição da fase móvel. Para substâncias ativas com estrutura ácida, é importante manter o pH entre 4 e 5 para que não haja conversão da forma básica para a ácida. Também é necessário ter em atenção o aumento da basicidade da fase móvel pois a pHs próximos de 6, a interconversão da forma ácida para a básica é facilitada [30].

Se os analitos em estudo corresponderem a bases ou ácidos, como é o caso na presente validação, a alteração do pH faz com que o fator de retenção e a seletividade varie de forma significativa. É importante que o pH da fase móvel neste tipo de compostos se situe \pm uma unidade de pH que o pKa. No caso da molécula em estudo, o pH da fase móvel deve situar-se entre 3,3 e 5,3.

A molécula em estudo apresenta um baixo peso molecular (<2000 g/mol) sendo aconselhável o uso de uma fase móvel em gradiente de composição entre a fase aquosa e a fase orgânica. Este sistema também é aconselhável quando o método analítico é constituído por um número elevado de analitos a separar (com diferentes tempos de retenção), uma vez que a variação da composição da fase móvel ao longo da corrida faz variar com a afinidade da mesma com os analitos, o que melhora a resolução dos mesmos [11].

Uma vez que diversos analitos em estudo nesta validação apresentam características ácidas ou básicas, gradientes com soluções orgânicas (ACN, MeOH ou THF) e soluções tampão são os mais utilizados. É importante ter em atenção à composição do gradiente uma vez que os tampões fosfato apresentam baixas solubilidades com o orgânico e não é recomendável o uso de mais de 70% do mesmo na fase móvel (máximo de 60% na validação em estudo). Em relação ao orgânico utilizado, o THF apresenta alguns

problemas de absorvância em comprimentos de onda mais baixos (inferiores a 219 nm) mas a um comprimento de onda de 254 nm o uso deste orgânico não é problema [10,11].

As validações realizadas à molécula em estudo usam colunas C8 ou C18 em fase reversa pois são colunas adequadas para moléculas com baixo peso molecular e ainda indicadas para moléculas que realizem ligações de hidrogénio com a fase móvel e a fase estacionária [11].

Em ensaios de degradação forçada da molécula em estudo, verifica-se estabilidade da mesma em ensaios de temperatura apresentando degradações a temperatura a 90°C. Ainda apresenta degradações em meio ácido ao invés de meio básico, em que a substância ativa é estável [33].

3 Materiais e Métodos

Para a validação de um método analítico de compostos relacionados é necessário impurezas e reagentes de modo a que a mesma se possa realizar. Nesta validação, as impurezas que se validaram encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Impurezas utilizadas na validação do método analítico

	Utilizadas	Especificação ⁵
Impureza A	√	≤ 0,25%
Impureza H	√	≤ 0,25%
Impurezas conhecidas	-	≤ 0,25%
Outras Impurezas	-	≤ 0,2%
Total de Impurezas	-	≤ 1,2%

De modo a que seja possível quantificar impurezas conhecidas e desconhecidas, utilizou-se o ativo à concentração de especificação das mesmas admitindo-se que o fator de resposta das Impurezas e da Substância Ativa corresponde a um, ou seja, à mesma concentração, ambos tenham aproximadamente a mesma resposta.

3.1 Condições Cromatográficas

O sistema cromatográfico da validação apresenta as seguintes condições (Tabela 3.2):

Tabela 3.2 - Condições cromatográficas descritas no método a validar

Equipamento	HPLC com detetor UV/DAD
Coluna Cromatográfica	Kromasil 100 C-18, 5µm, 250x4,6mm
Fluxo	1,8ml/min
Volume de Injeção	20 µL
Fase móvel	Gradiente
Temperatura da Coluna	30°C
Temperatura das Amostras	Ambiente
Comprimento de Onda UV/DAD	254 nm/(220nm a 400nm)
Tempo de Corrida	35 min
Solvente	Diluyente (ACN: THF: H2O)

⁵ Concentração de especificação em relação à concentração de trabalho de 800µg/mL

A fase móvel corresponde a um gradiente entre três soluções, ou seja, a composição da mesma varia à medida que o avança o tempo de corrida (Tabela 3.3). Sendo assim, a fase móvel apresenta a seguinte composição:

- Eluente A: Solução de 0,05M de fosfato de amónia, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ajustado a pH 5,0 com hidróxido de amónia, NH_4OH (25%)
- Eluente B: ACN
- Eluente C: THF

Tabela 3.3 - Proporção do gradiente da Fase Móvel

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Eluente C (%)
0	60	31	9
1	60	31	9
10	46	50	4
11	46	50	4
20	26	70	4
25	26	70	4
30	60	31	9
35	60	31	9

3.2 Preparação de soluções

Eluente A

Pesou-se aproximadamente 28,76 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ para um balão de 5L. Adicionou-se água purificada antes de perfazer o volume final. Acertou-se a solução a pH 5,0 com uma solução de hidróxido de amónia, NH_4OH a 25% e perfez-se o volume final. Filtrou-se o eluente num sistema de vácuo e com filtros aquosos 0,22 μm .

Diluyente

Preparou-se uma solução de diluyente ACN:THF:H₂O nas proporções 60:5:35% (v/v/v).

Solução Padrão

Pesou-se 20 mg de ativo para um balão volumétrico de 50 mL. Levou-se 5 min a um equipamento de Ultrassons. Procedeu-se à diluição de 0,5 mL da solução mãe para um balão de 100 mL. ($C_{\text{ativo}}=2,0 \mu\text{g/mL}$)

Solução Impureza

Pesou-se 5 mg de Impurezas para um balão de 25 mL e diluiu-se com solução diluente. Levou-se 5 min a um Ultrassons e perfez-se o volume final. ($C_{\text{Impureza}}=200,0 \mu\text{g/mL}$)

Solução Amostra

Pesou-se aproximadamente 800 mg de produto acabado para um balão de 100 mL. Levou-se 5 min a um Ultrassons e perfez-se com diluente o volume final. Filtrou-se a solução com filtros de membrada de politetrafluoretileno, PTFE. ($C_{\text{ativo}}=800,0 \mu\text{g/mL}$)

Solução Placebo

Pesou-se aproximadamente 733 mg de um preparado de Placebo para um balão de 100 mL. Levou-se 5 min a um Ultrassons e perfez-se com diluente o volume final. Filtrou-se a solução com filtros PTFE.

4 Discussão dos resultados obtidos

4.1 Adequabilidade do Sistema Cromatográfico

Para verificar a adequabilidade do sistema cromatográfico, procedeu-se à preparação da solução padrão (ver preparação na pág. 28) e injetou-se a mesma seis vezes com o objetivo de verificar se o RSD da área do analito e do tempo de retenção entre injeções, é menor ou igual a 5%, o que corresponde ao critério de aceitação da adequabilidade do sistema. Os resultados do estudo da adequabilidade do sistema encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Resultados do estudo da Adequabilidade do Sistema Cromatográfico

Nº da Amostra	Tempo de retenção (min)	Área
1	10,19	186763
2	10,18	186502
3	10,17	186901
4	10,16	187115
5	10,16	185926
6	10,16	186938
Média	10,17	186690,83
SD (%)	0,01	426,85
RSD (%)	0,12	0,23

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo

Pode-se verificar que o sistema cromatográfico é adequado dado que cumpre os critérios de aceitação.

4.2 Especificidade

De forma a avaliar a especificidade do método, preparou-se individualmente amostras de cada um dos compostos que se encontram presentes no sistema:

- Solução Padrão;
- Solução Amostra;
- Solução Placebo;
- Solução Impureza A;
- Solução Impureza H;
- Solução Amostra fortificada com impurezas;
- Diluente;

- Eluente A.

A especificidade é garantida pela ausência de interferências nos tempos de retenção entre os compostos acima referidos, cujos respectivos valores e cromatogramas se encontram na Tabela 4.2 e Figura 4.1 a 4.8, respectivamente.

Tabela 4.2 - Resultado do estudo da Especificidade

Amostra	Tempo de retenção (min)	Figura
Solução Padrão	10,2 (Ativo)	Figura 4.1
Solução Amostra	10,2 (Ativo) 9,6 (Impureza A) 15,1 (Impureza H) 7,2 (Impureza Conhecida 1) 13,9 (Impureza Conhecida 2) 12,4 (Placebo)	Figura 4.2
Solução Placebo	12,4 (Placebo)	Figura 4.3
Impureza A	9,4 (Impureza A)	Figura 4.4
Impureza H	10,2 (Ativo) 15,3 (Impureza H)	Figura 4.5
Eluente A	-	Figura 4.6
Solução Amostra fortificado com impurezas	10,3 (Ativo) 9,5 (Impureza A) 15,1 (Impureza H) 7,2 (Impureza Conhecida 1) 14,0 (Impureza Conhecida 2) 12,4 (Placebo)	Figura 4.7
Diluyente	-	Figura 4.8

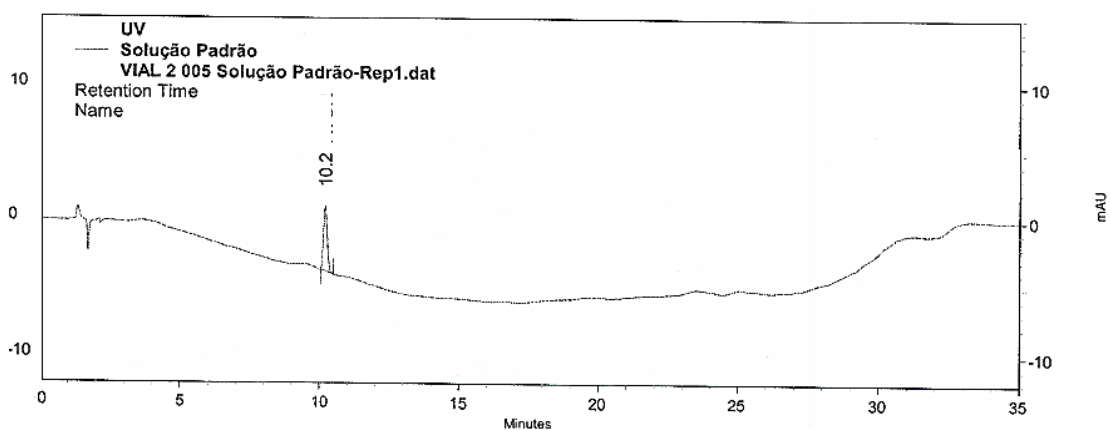


Figura 4.1 - Cromatograma do ensaio da especificidade relativamente à Solução Padrão

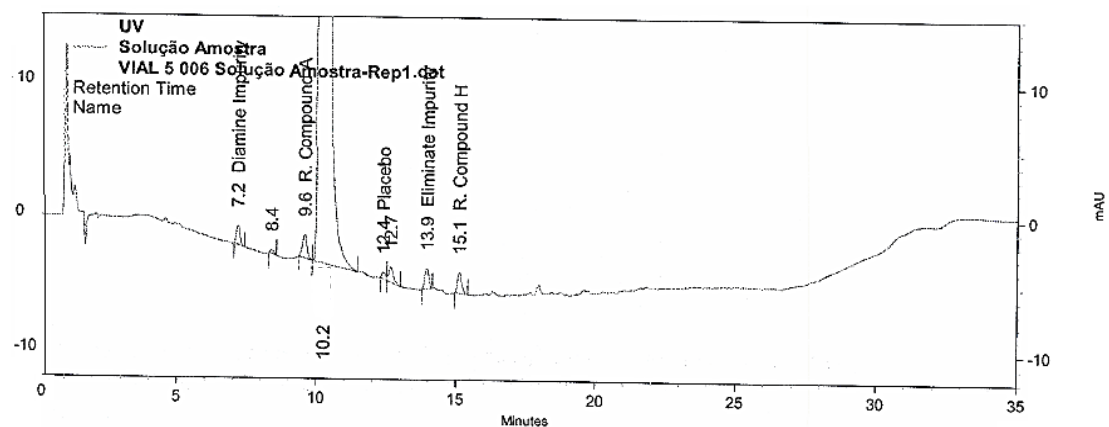


Figura 4.2 - Cromatograma do ensaio de Especificidade relativamente à Solução Amostra

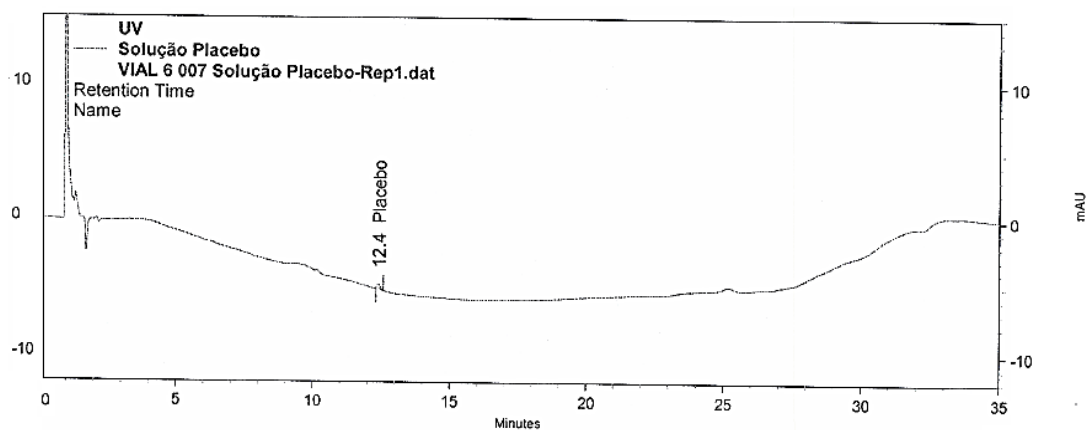


Figura 4.3 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente à solução Placebo

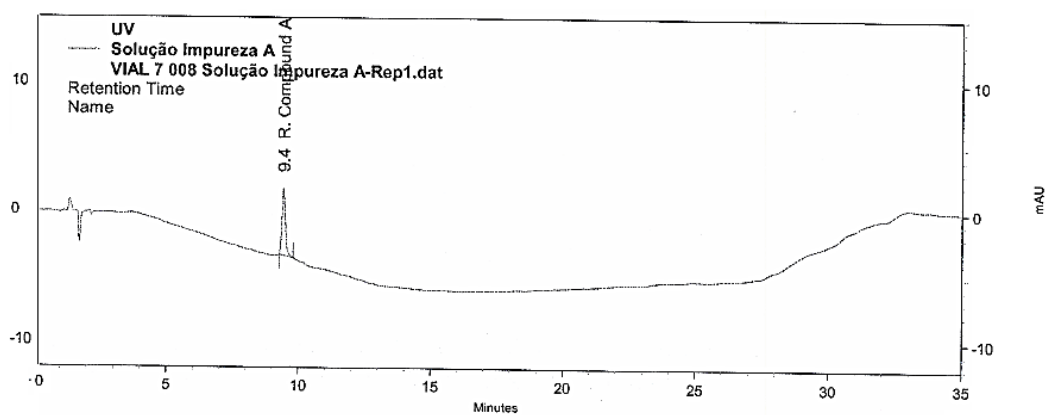


Figura 4.4 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente à solução Impureza A

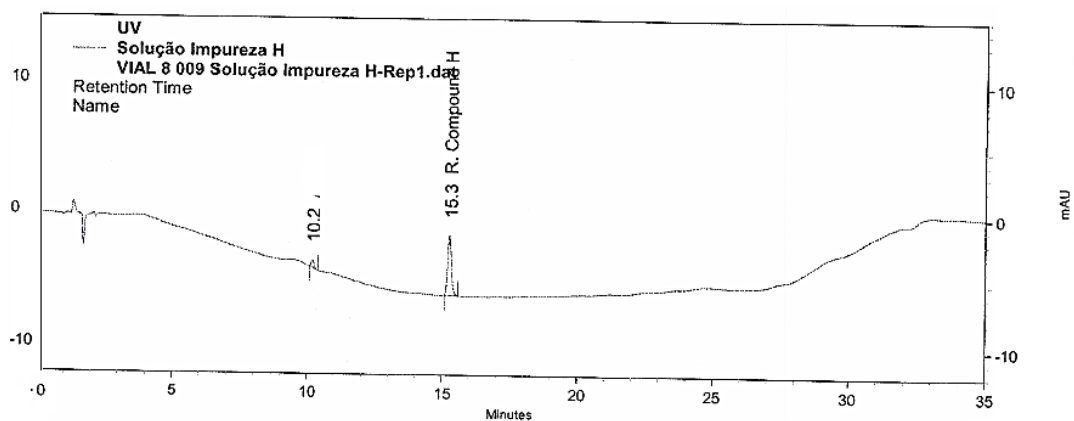


Figura 4.5 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente à solução Impureza H

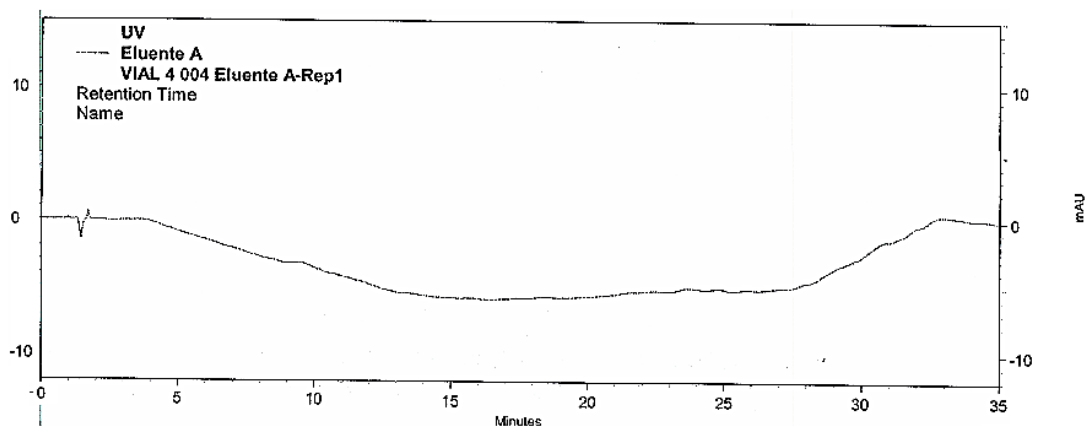


Figura 4.6 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente ao Eluente A

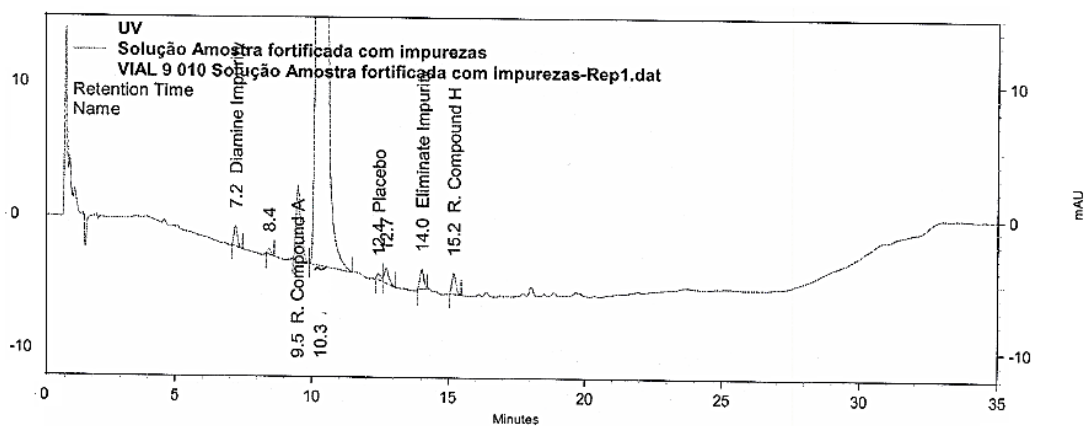


Figura 4.7 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente à solução fortificada com impurezas

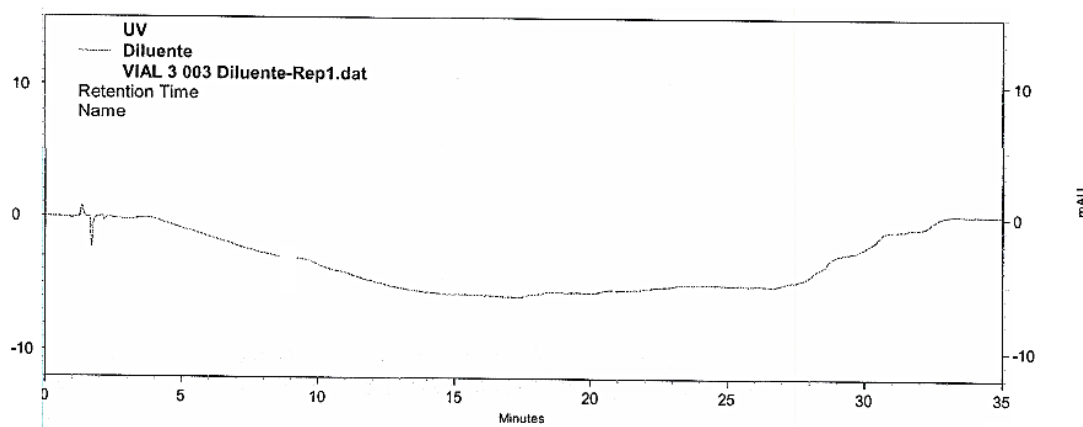


Figura 4.8 - Cromatograma obtido para o ensaio de Especificidade relativamente ao Diluente

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que cada analito em estudo apresenta um tempo de retenção definido sem que ocorra interferência dos restantes componentes do sistema ou matrizes, notando uma irregularidade relativamente à impureza H.

Conjugando os cromatogramas da Impureza H e do produto acabado fortificado com impurezas pode-se observar:

- Figura 4.5: A existência de dois picos cromatográficos, um correspondente à Impureza e outro pico correspondente ao ativo;
- Figura 4.7: Não se verificou o aumento do nível de resposta (área do pico) da Impureza H após fortificação da mesma na amostra de produto acabado.

Combinando estes dois acontecimentos, verifica-se que usando as condições experimentais descritas no método, ocorre a síntese da Impureza H no ativo tal como a literatura descreve [34].

Esta interconversão é minimizada caso haja uma preparação e injeção imediata da solução Impureza H (Ver Anexo A). No caso desta validação, a quantificação da Impureza H realizou-se através de uma quantificação indireta na medida em que ocorre a soma das áreas do pico da Impureza H com a área do pico que resulta da síntese da mesma em Substância Ativa [30].

4.3 Exatidão

De modo a averiguar a exatidão do método, prepararam-se 12 amostras de produto acabado e fortificou-se com a solução Impureza A (ver preparação na pág. 29) aos níveis de concentração de 50%, 100% e 150%, em que o nível 100% corresponde à concentração de especificação de cada impureza.

Para o ativo à concentração de especificação das impurezas desconhecidas, 1,6µg/mL (C=0,2%) e conhecidas, 2,0µg/mL (C=0,25%), prepararam-se o mesmo número de amostras utilizando o placebo como matriz (ver preparação pág. 29) e fortificaram-se do mesmo modo aos níveis de concentração de 50% a 150%;

Já para a exatidão da Impureza H (ver preparação na pág. 29), uma vez que existe um equilíbrio químico entre esta e o ativo (Figura 4.5), utilizou-se a matriz apenas com placebo ao invés de produto acabado para a determinação da exatidão da mesma.

Na medida de verificar a exatidão de um método, em que os critérios de aceitação da percentagem de recuperação dos analitos para os níveis de 100% e 150% apresenta um intervalo de 90% a 110%, e da percentagem de recuperação para o nível de 50% entre 85% a 115%

Os resultados da exatidão encontram-se nas Tabelas 4.3 a 4.6.

Tabela 4.3 - Resultados do estudo da exatidão do ativo a C=0,2%

Nível de Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	A1	96,53	99,23	97,59
	A2	107,50	100,89	99,56
	A3	104,03	100,42	97,46
	A4	-	106,23	-
	A5	-	96,13	-
	A6	-	95,11	-
12 Determinações				
Média (%)		100,10		
SD (%)		4,19		
RSD (%)		4,19		
IC 95% (%)		97,32 – 102,88		

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

Tabela 4.4 - Resultados do estudo da exatidão do ativo a C=0,25%

Nível de Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	A1	95,50	98,26	104,71
	A2	99,76	98,76	103,05
	A3	95,97	101,92	105,11
	A4	-	106,68	-
	A5	-	105,35	-
	A6	-	103,64	-
12 Determinações				
Média (%)		101,56		
SD (%)		3,81		
RSD (%)		3,75		
IC 95% (%)		99,03-104,09		

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

Tabela 4.5 - Resultados do estudo da exatidão da Impureza A

Nível de Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	A1	96,11	93,33	97,00
	A2	99,35	95,05	99,29
	A3	99,37	95,32	102,53
	A4	-	98,29	-
	A5	-	97,67	-
	A6	-	97,99	-
12 Determinações				
Média (%)		97,61		
SD (%)		2,46		
RSD (%)		2,52		
IC 95% (%)		95,98-99,24		

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

Tabela 4.6 - Resultados do estudo da exatidão da Impureza H

Nível de Concentração		50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	A1	102,96	106,94	106,31
	A2	102,22	105,57	110,46
	A3	103,24	106,89	106,85
	A4	-	108,89	-
	A5	-	107,39	-
	A6	-	106,06	-
12 Determinações				
Média (%)		106,15		
SD (%)		2,41		
RSD (%)		2,27		
IC 95% (%)		104,55 - 107,75		

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

Foi realizada também a exatidão ao limite de quantificação de forma a ter a confirmação que o método é exato não só à concentração de especificação, mas também à concentração do limite de quantificação. A esta concentração, tem-se como critérios de aceitação uma percentagem de recuperação que se situa entre 85% e 115%.

Posto isto, foram preparadas 6 amostras com os analitos à concentração do LQ e os resultados encontra-se na Tabela 4.7

Tabela 4.7 - Resultados do estudo da exatidão do Ativo, Impureza A e H à concentração do Limite de Quantificação

Composto		Ativo (c=0.2%)	Impureza A	Impureza H
Recuperação (%)	A1	94,35	96,13	97,39
	A2	99,76	92,79	101,15
	A3	102,27	94,92	96,75
	A4	101,23	94,99	104,12
	A5	93,74	95,17	100,50
	A6	95,00	95,86	98,02
Média (%)		97,73	94,98	99,65
SD (%)		3,79	1,18	2,80
RSD (%)		9,88	1,24	2,81
IC 95% (%)		93,37 – 102,08	93,63 – 96,33	96,44 – 102,87

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

Com os resultados obtidos, conclui-se que o método é exato para a quantificação dos componentes presentes no sistema cromatográfico uma vez que se observa para todos os casos, uma percentagem de recuperação entre 90 e 110%.

4.4 Linearidade

Para o estudo da linearidade do método, procedeu-se à preparação de amostras, A1 a A11 cujo nível de concentração aumentava gradualmente entre ambas (de 5% a 200% da concentração de especificação). Posteriormente procedeu-se à injeção em triplicado de cada amostra e compilou-se os dados obtidos da resposta dos analitos (áreas) em função do aumento concentração.

Cumprem os critérios de aceitação os analitos que apresentem um coeficiente de correlação (r) superior a 0,99, um coeficiente de Determinação (r^2) superior a 0,99, os limites de interceção no IC_{95%} devem conter o valor zero e os resíduos devem apresentar uma distribuição aleatória.

Os resultados deste estudo estão presentes nas Tabelas 4.8 a 4.11 e nas Figuras 4.9 a 4.16.

Tabela 4.8 -Resultados do estudo da linearidade do ativo à C=0,2%

Amostra N°	Ativo (µg/mL)	Área do pico	RSD (%)
1	0,08	5009,33	2,69
2	0,16	13455,67	2,45
3	0,31	28953,33	1,35
4	0,78	79399,33	0,23
5	1,25	125359,00	0,09
6	1,40	142924,00	0,36
7	1,56	157428,33	0,43
8	1,72	180471,67	0,28
9	1,87	192226,00	0,39
10	2,34	236832,00	0,50
11	3,12	318772,33	0,52
Ordenada na origem		-2275,87	
Declive		103213,99	
Coefficiente de Correlação (r)		0,999	
Coefficiente de Determinação (r²)		0,999	
Limites de Interceção no IC_{95%}		Inferior	Superior
		-5020,95	469,22

RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

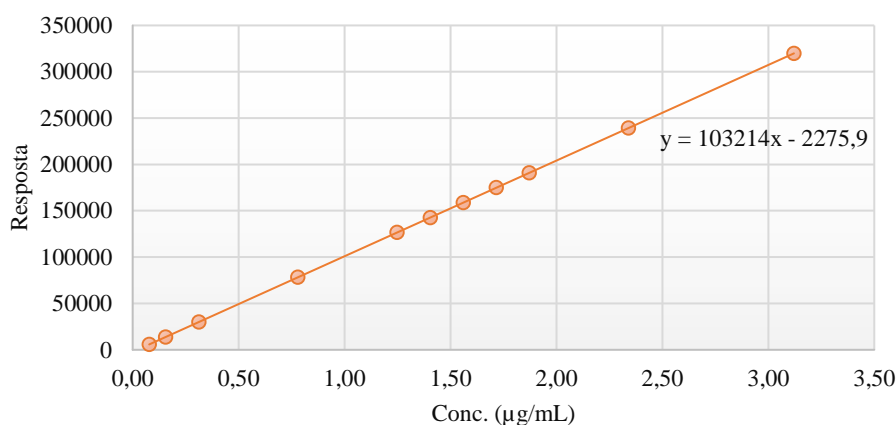


Figura 4.9 - Regressão Linear da Substância Ativa a C=0.2%

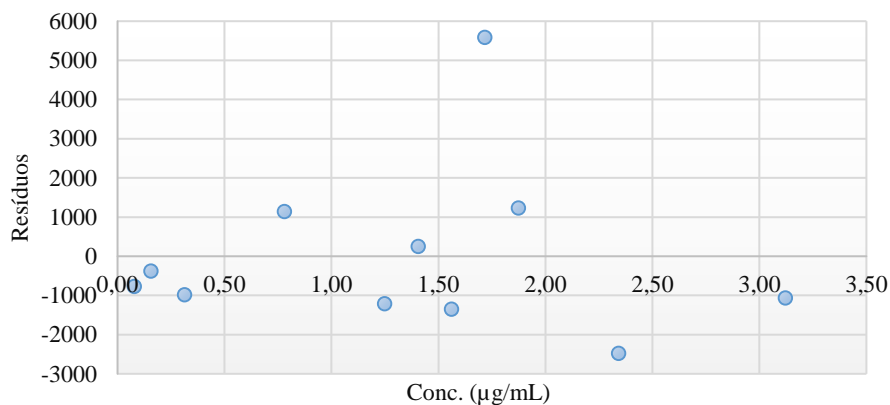


Figura 4.10 - Resíduos da regressão linear da Substância Ativa a C=0.2%

Tabela 4.9 - Resultados do estudo da linearidade da Substância Ativa a C=0.25%

Amostra N°	Ativo (µg/mL)	Área do pico	RSD (%)
1	0,10	8960,00	4,19
2	0,19	17981,33	6,21
3	0,39	37933,67	4,27
4	0,97	93893,00	0,69
5	1,56	150012,33	1,01
6	1,75	169622,00	0,65
7	1,94	188181,00	0,75
8	2,14	208431,00	0,21
9	2,33	226693,00	0,63
10	2,92	292663,00	0,15
11	3,89	393513,00	2,93
Ordenada na origem		-4980,66	
Declive		101155,21	
Coefficiente de Correlação (r)		0,999	
Coefficiente de Determinação (r²)		0,999	
Limites de Interceção no IC_{95%}		Inferior	Superior
		-10268,17	306,84

RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

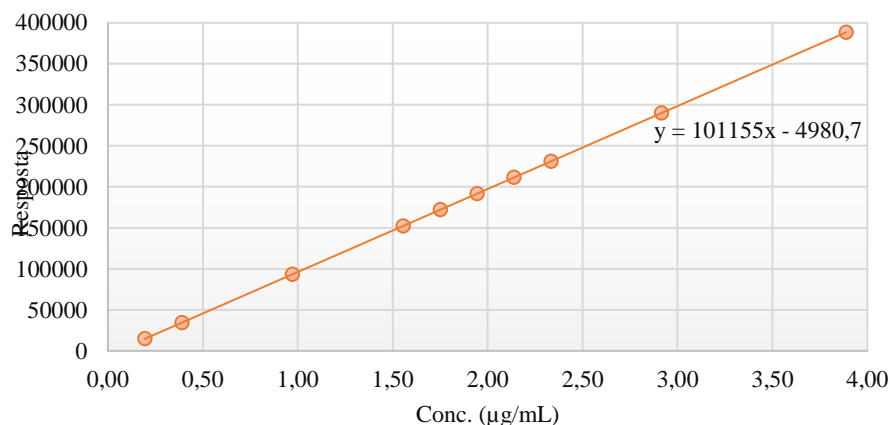


Figura 4.11 - Regressão Linear da Substância Ativa a C=0.25%

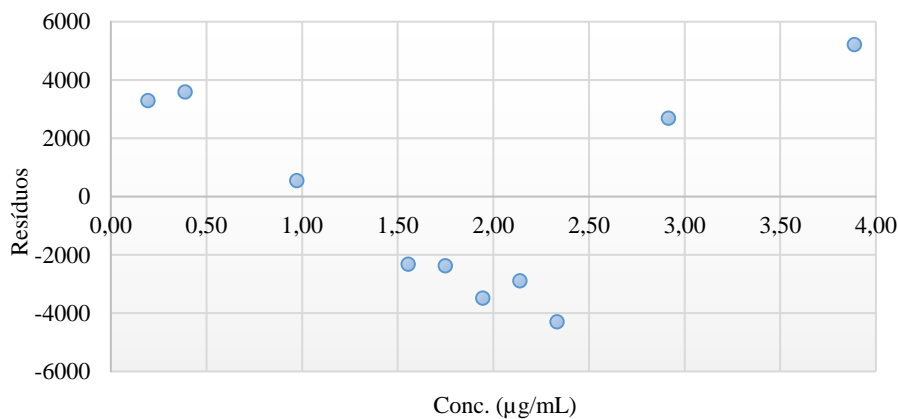


Figura 4.12 - Resíduos da regressão linear da Substância Ativa a C=0.25%

Tabela 4.10 - Resultados do estudo da linearidade da Impureza A

Amostra N°	Impureza A (µg/mL)	Área do pico	RSD (%)
1	0,10	9206,00	20,01
2	0,20	18022,33	7,79
3	0,39	39081,33	2,59
4	0,98	93249,00	0,46
5	1,56	149100,33	0,43
6	1,76	170392,00	0,45
7	1,95	189382,00	0,18
8	2,15	207497,67	0,69
9	2,34	228481,00	0,14
10	2,93	288169,00	0,32
11	3,90	391259,33	0,56
Ordenada na origem		-2934,88	
Declive		99525,44	
Coeficiente de Correlação (r)		0,999	
Coeficiente de Determinação (r ²)		0,999	
Limites de Interceção no IC _{95%}		Inferior	Superior
		-6592,78	723,01

RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

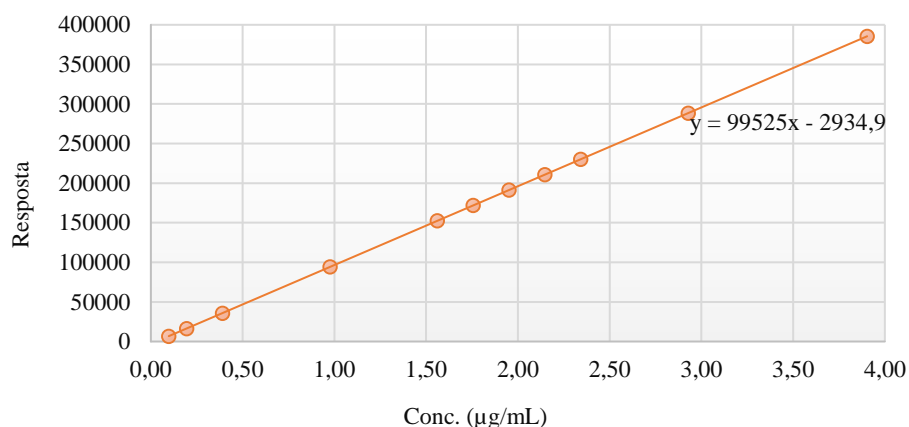


Figura 4.13 - Regressão linear da Impureza A

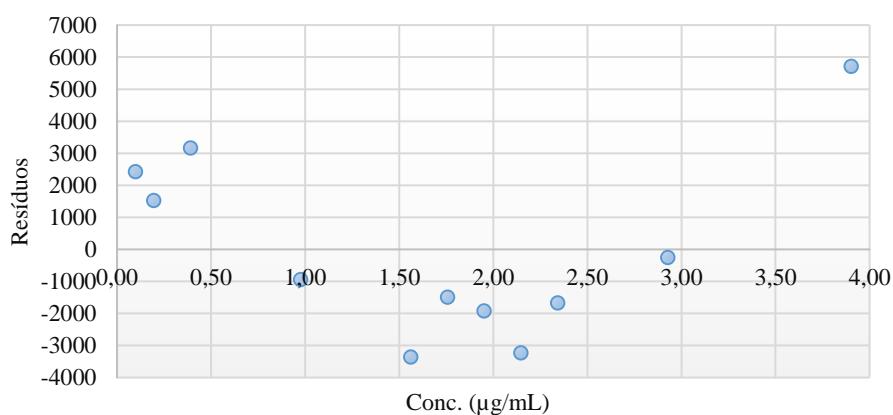


Figura 4.14 - Resíduos da regressão linear da Impureza A

Tabela 4.11 - Resultados do estudo da linearidade da Impureza H

Amostra N°	Impureza A (µg/mL)	Área do pico	RSD (%)
1	0,10	7607,33	3,77
2	0,20	16426,33	3,34
3	0,40	33776,00	2,30
4	1,00	100570,33	1,60
5	1,60	156833,00	1,10
6	1,80	167307,67	0,64
7	2,00	198078,67	1,56
8	2,20	212225,33	1,33
9	2,40	235361,67	0,79
10	3,01	297337,33	0,29
11	4,01	402108,67	0,40
Ordenada na origem		-4953,52	
Declive		100447,29	
Coeficiente de Correlação (r)		0,999	
Coeficiente de Determinação (r ²)		0,998	
Limites de Interceção no IC _{95%}		Inferior	Superior
		-9996,94	89,90

RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

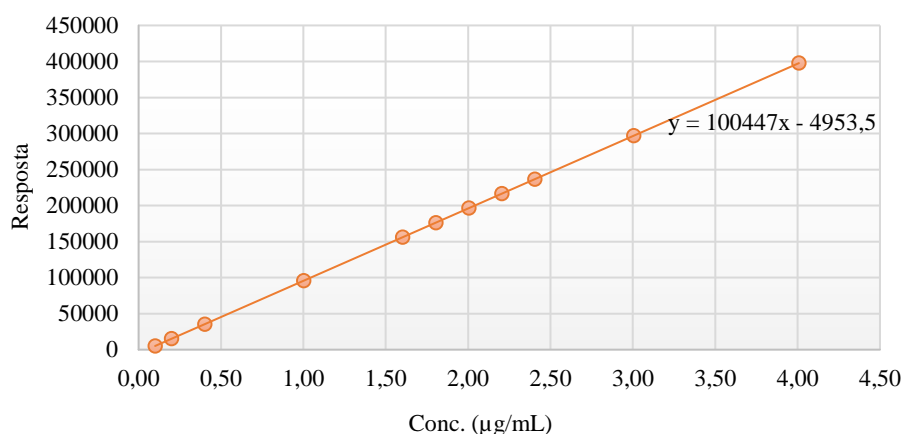


Figura 4.15 - Regressão linear da Impureza H

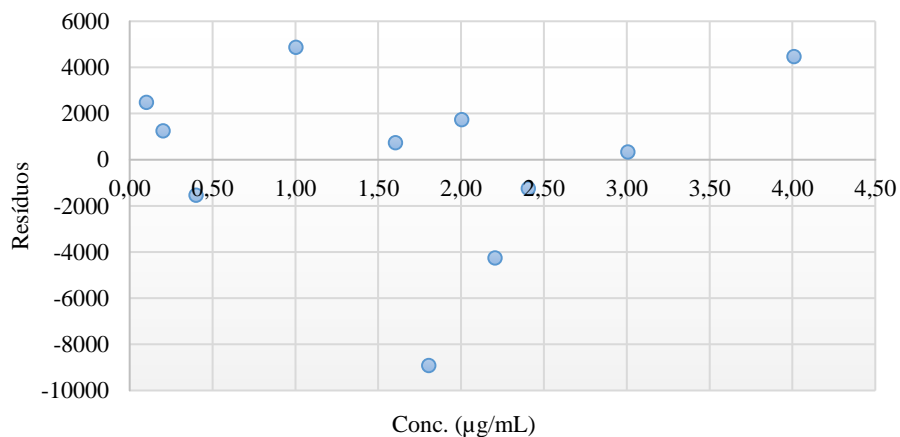


Figura 4.16 - Resíduos da regressão linear da Impureza H

De acordo com os resultados anteriores, verifica-se que o método cumpre os critérios de aceitação e é linear para os compostos analisados.

Fator de resposta

Após a determinação das retas das regressões lineares, e com o declive das mesmas, é possível calcular o fator de resposta das Impurezas A e H, em que a razão entre o declive do ativo e da Impureza corresponde ao valor do Fator de Resposta.

Tabela 4.12 - Resultados do Fator de Resposta a partir do declive das retas da Linearidade

Componente	Declive	Fator de resposta
Ativo	101155,21	-
Impureza A	99525,44	0,98
Impureza H	100447,29	0,99

O capítulo 2.2.46 da Farmacopeia Europeia descreve que, para fatores de resposta entre 0,8 e 1,2 admite-se o mesmo de 1 em análises correntes [5].

4.5 Limite de Detecção

A estimativa dos valores para os Limites de Detecção é realizada através da análise de soluções de concentração conhecida, em que é estabelecido um mínimo nível de concentração. A este nível os picos têm que ser visualmente detetados, apresentar um RSD inferior ou igual a 20 e uma razão sinal-ruído superior a 3, que correspondem aos critérios de aceitação neste tipo de ensaio.

De acordo com a ICH, o procedimento para a verificação dos Limites de Detecção passa pela análise das retas obtidas no ensaio da Linearidade e a partir do declive e do erro padrão associado à ordenada na origem (Equação 2.12), verificar se as concentrações calculadas cumprem com os critérios de aceitação [35].

Após comprovação experimental deste primeiro procedimento, verificou-se que apenas a Impureza H cumpriu com os critérios de aceitação. Posteriormente, aumentou-se a concentração do Limite de Detecção para a Impureza A e para a substância ativa correspondendo à concentração da segunda amostra do ensaio da Linearidade (L2). As concentrações e respetivas percentagens relativamente à concentração de trabalho encontram-se na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 –Concentração mínima verificada para os Limites de Detecção

	Limite de Detecção	
	(µg / mL)	(%)
Substância Ativa	0,160	0,020
Impureza A	0,200	0,025
Impureza H	0,095	0,012

Após análise dos valores obtidos para as concentrações, foi possível obter resultados satisfatórios, ou seja, resultados que cumpriam com os critérios de aceitação e os mesmos encontram-se na Tabela 4.14.

Tabela 4.14- Resultados do estudo dos Limites de Detecção

Amostra	Substância Ativa	Impureza A	Impureza H
1	3496	5386	7371
2	3482	4973	7391
3	3393	4996	7236
4	3275	5080	7078
5	3281	5240	7721
6	3441	5221	6819
Média	3394,67	5149,33	7269,33
SD	97,25	160,49	306,48
RSD (%)	2,86	3,12	4,22
S/N	6,07	8,20	5,77

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; S/N: Razão Sinal-Ruído

Nas figuras 4.17 e 4.18 é possível de observar os cromatogramas obtidos para os Limites de Detecção.

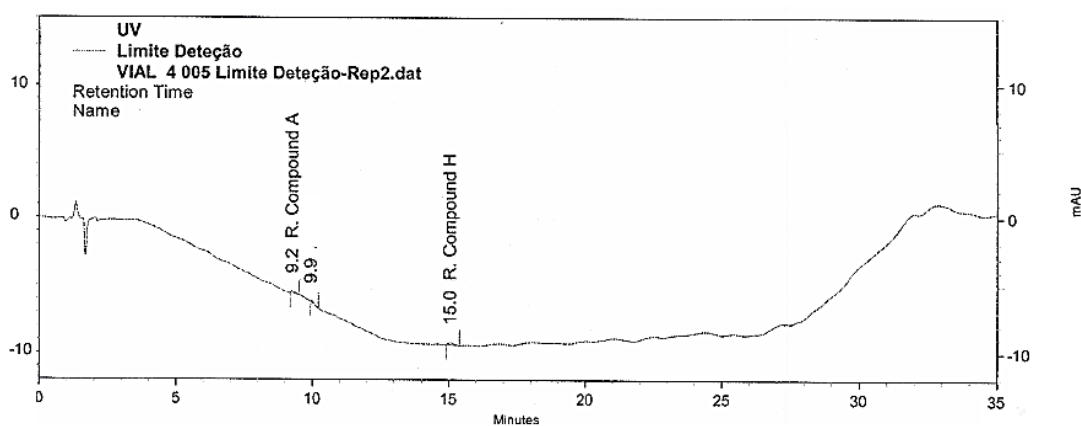


Figura 4.17 - Cromatograma obtido para o Limite de Detecção da Impureza H

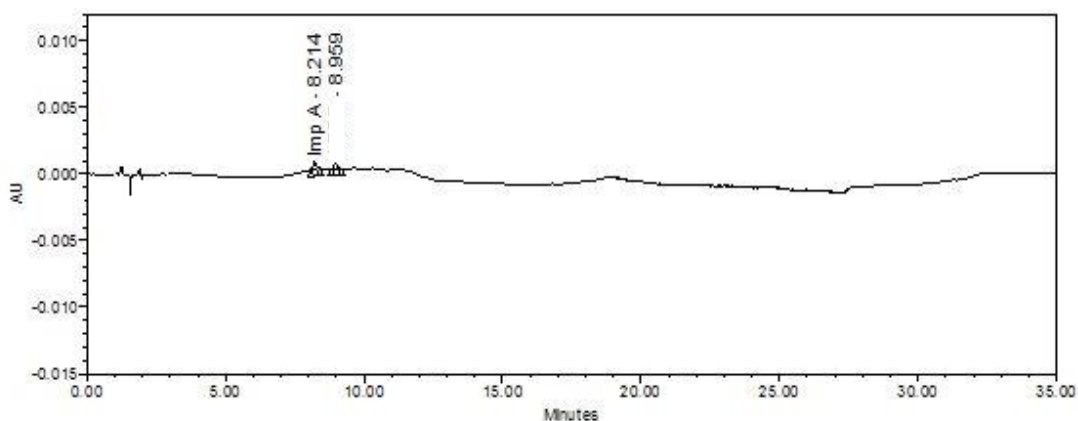


Figura 4.18 - Cromatograma obtido para o Limite de Detecção da Impureza A e Substância Ativa a C=0.2%

4.1 Limite de Quantificação

Seguindo a linha de raciocínio do ensaio anterior, para a estimativa dos Limites de Quantificação recorreu-se do mesmo modo, numa fase inicial, ao ensaio da Linearidade e partir do declive e do erro padrão associado à ordenada na origem (Equação 2.13), calculou-se as concentrações mínimas de forma a que sejam quantificadas com certa precisão e exatidão, apresentando um RSD inferior ou igual a 10 e uma razão sinal-ruído superior a 10.

Também como nos Limites de Detecção, verificou-se que apenas a Impureza H cumpriu com os critérios de aceitação. Posteriormente, aumentou-se a concentração para a Impureza A e para a substância ativa correspondendo à concentração da terceira amostra do ensaio da Linearidade (L3). As concentrações e respetivas percentagens relativamente à concentração de trabalho podem ser observadas na Tabela 4.15.

Tabela 4.15- Concentração mínima verificada para os Limites de Quantificação

	Limite de Quantificação	
	($\mu\text{g} / \text{mL}$)	(%)
Substância Ativa	0,320	0,040
Impureza A	0,400	0,050
Impureza H	0,287	0,036

Verificou-se que, pelos valores dos analitos obtidos para as concentrações (Tabela 4.16), foi possível de se obter resultados com RSD inferior a 10 e uma razão sinal-ruído superior a 10.

Tabela 4.16 - Resultados do estudo dos Limites de Quantificação

Amostra	Substância Ativa	Impureza A	Impureza H
1	7238	9248	23754
2	7257	9378	23566
3	7312	9403	21689
4	7241	9304	23162
5	7262	9143	22522
6	7235	9566	21596
Média	7257,50	9340,33	22714,83
SD	28,81	144,95	932,27
RSD (%)	0,40	1,55	4,10
S/N	12,67	16,06	15,31

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; S/N: Razão Sinal-Ruído

Nas Figuras 4.19 e 4.20 encontram-se presentes os cromatogramas obtidos no ensaio dos Limites de Quantificação para os analitos em estudo.

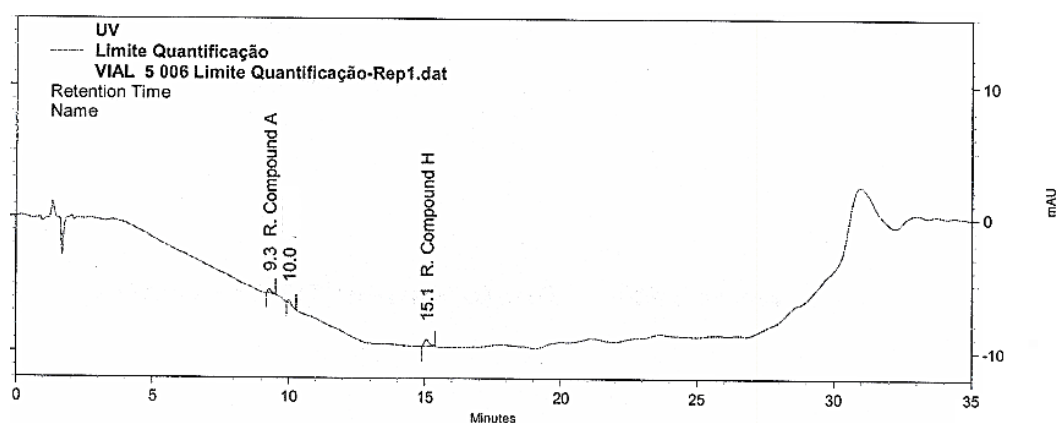


Figura 4.19 – Cromatograma obtido para o Limite de Quantificação da Impureza H

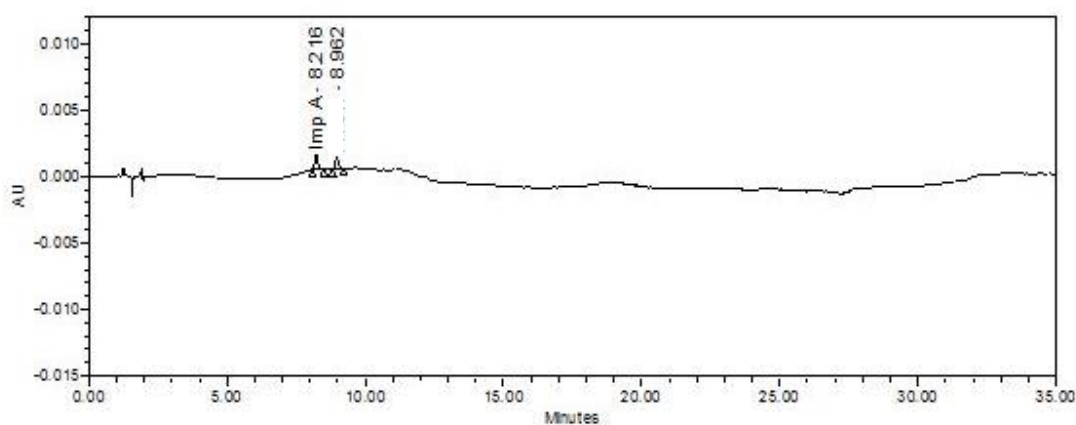


Figura 4.20 - Cromatograma obtido para os Limites de Quantificação da Impureza A e Substância Ativa a C=0.25%

4.2 Precisão

De modo a que o método analítico seja preciso, é necessária a concordância de resultados em relação a amostras preparadas a partir de uma solução homogênea. Assim sendo, é necessário avaliar parâmetros como a repetibilidade do sistema, repetibilidade do método e precisão intermédia.

Repetibilidade do Sistema

A repetibilidade do sistema é avaliada sobre a mesma amostra com o objetivo de verificar que o RSD é inferior ou igual 5, o que corresponde ao critério de aceitação deste ensaio.

Posto isto, injetou-se a mesma amostra seis vezes e verificou-se se os tempos de retenção e as respostas do analito (Tabela 4.17) se encontravam inferiores ao valor máximo permitido.

Tabela 4.17 - Resultados do estudo da Repetibilidade do Sistema

Amostra	Tempo de retenção (min)	Área
1	10,19	186763
2	10,18	186502
3	10,17	186901
4	10,16	187115
5	10,16	185926
6	10,16	186938
Média	10,17	186690,83
SD (%)	0,01	426,85
RSD (%)	0,12	0,23

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo

Com os resultados obtidos, conclui-se que a repetibilidade do sistema cumpre com o critério de aceitação.

Repetibilidade do método

A repetibilidade do método para a Impureza A foi realizada através da preparação de seis amostras de produto acabado às quais fortificaram-se com a mesma impureza.

Para as impurezas desconhecidas (C=0,2%) e conhecidas (C=0,25%), preparou-se seis amostras e utilizou-se o ativo à concentração de especificação da mesma na matriz Placebo.

No caso da Impureza H, voltou-se a utilizar o Placebo como matriz e preparou-se igualmente seis amostras com fortificação da mesma.

Para ambos os casos, o critério de aceitação cinge-se no RSD em que este tem que ser inferior a 10.

Os resultados da repetibilidade do método podem ser verificados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 - Resultados do estudo da Repetibilidade do Sistema

Amostra	Ativo (0.2%)	Ativo (0.25%)	Impureza A (0.25%)	Impureza H (0.25 %)
1	99,23	98,26	93,33	106,94
2	100,89	98,76	95,05	105,57
3	100,42	101,92	95,32	106,89
4	106,23	106,68	98,29	108,49
5	96,13	105,35	97,67	107,39
6	95,11	103,64	97,99	106,06
Média (%)	99,67	102,44	96,27	106,89
SD (%)	3,97	3,44	2,00	1,02
RSD (%)	3,98	3,36	2,08	0,96
IC_{95%} (%)	95,11 - 104,23	98,48 – 106,39	93,98 - 98,57	105,71 - 108,06

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

Verifica-se que os resultados cumprem o critério de aceitação e com isto conclui-se a repetibilidade do método como parâmetro de precisão.

Precisão intermédia

O último parâmetro de análise de precisão de um método analítico corresponde à precisão intermédia. Esta deve ser realizada por diferentes analistas, em diferentes dias de modo a verificar se o RSD entre injeções de cada ensaio e o RSD entre ensaios é igual ou inferior a 10% e a 15%, respetivamente.

Deste modo, preparou-se uma série de soluções placebo, por diferentes analistas, em diferentes dias e em equipamentos distintos, em que se fortificou com ativo à concentração de especificação das impurezas desconhecidas (C=0,2%) e conhecidas, (C=0,25%), com Impureza A e H à concentração de trabalho (C=0,25%).

Nas Tabelas 4.19 e 4.20 encontram-se os resultados do estudo da precisão intermédia do método.

Tabela 4.19 - Resultados do estudo da precisão intermédia do método da Substância Ativa a C=0.2% e C=0.25%

Amostra	Ativo a C=0,2 %		Ativo a C=0,25 %	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
1	99,23	100,74	98,26	100,43
2	100,89	99,74	98,76	101,51
3	100,42	102,12	101,92	101,00
4	106,23	99,10	106,68	100,37
5	96,13	100,55	105,35	99,99
6	95,11	99,61	103,64	99,23
Recuperação média	99,67	100,31	102,44	100,42
SD (%)	3,97	1,08	3,44	0,79
RSD (%)	3,98	1,07	3,36	0,79
IC_{95%} (%)	95,11 - 104,23	99,08-101,55	98,48 - 106,39	99,51-101,33
Recuperação média	99,99		101,43	
SD (%)	2,79		2,60	
RSD (%)	2,79		2,57	
IC_{95%} (%)	98,14-101,84		99,70-103,15	

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%; Ensaio 1- Realizado pelo 1º analista; Ensaio 2 – Realizado pelo 2º analista

Tabela 4.20 – Resultados do estudo da precisão intermédia do método da Impureza A e H

Amostra	Impureza A		Impureza H	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
1	93,33	99,65	106,94	109,3
2	95,05	101,51	105,57	106,9
3	95,32	100,08	106,89	106,5
4	98,29	99,92	108,49	109,3
5	97,67	99,85	107,39	108,6
6	97,99	98,68	106,06	110,4
Recuperação média	100,10	99,94	106,89	108,49
SD (%)	4,19	0,91	1,02	1,52
RSD (%)	4,19	0,91	0,96	1,50
IC_{95%} (%)	97,32 - 102,88	98,90-100,99	105,71-108,06	106,74-110,23
Recuperação média	98,11		107,69	
SD (%)	2,42		1,49	
RSD (%)	2,47		1,38	
IC_{95%} (%)	96,50 - 99,72		106,7-108,68	

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%; Ensaio 1- Realizado pelo 1º analista; Ensaio 2 – Realizado pelo 2º analista

Comparando os resultados obtidos entre ensaios de cada analista, verifica-se que para a precisão intermédia do princípio ativo à concentração de 0,2% e 0,25% da concentração de especificação, da Impureza A e H, os valores de percentagem de recuperação cumprem com os critérios de aceitação.

4.3 Robustez

De forma a analisar a robustez de um método, prepararam-se três amostras de placebo que posteriormente, foram fortificadas com as Impurezas e a Substância Ativa ao nível de concentração correspondente a 100%.

O método diz-se robusto se, face às alterações realizadas no método, o RSD entre ambos é inferior ou igual a 10%.

As alterações ao método realizaram-se ao nível de temperatura (25°C e 35°C), comprimento de onda (252 nm e 256 nm) e fluxo (1,6 mL/min e 1,9 mL/min).

Os resultados da robustez do método encontram-se nas Tabelas 4.21 a 4.24.

Tabela 4.21 – Resultados do estudo da Robustez da Substância Ativa a C=0,2%

Condições Modificadas	Resultados (%) (A1, A2, A3)	Média (%)	S.D.	R.S.D (%)
Tal qual	99,23 100,89 100,42	100,18	0,85	0,85
Fluxo 1.6 mL/min	99,24 100,82 97,47	99,18	1,68	1,69
Fluxo 1.9 mL/min	101,56 102,91 100,44	101,64	1,23	1,21
Temperatura 25 °C	100,57 102,47 100,68	101,24	1,07	1,05
Temperatura 35 °C	99,16 100,14 98,099	99,13	1,02	1,03
Comprimento de onda 252 nm	101,445 102,65 101,05	101,72	0,83	0,82
Comprimento de onda 256 nm	99,27 101,01 97,97	99,42	1,53	1,54
Média (%)	100,36			
SD (%)	1,50			
RSD (%)	1,49			
IC_{95%} (%)	99,66 - 101,05			

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC_{95%} = Intervalo de Confiança a 95%;

Tabela 4.22 - Resultados do estudo da Robustez da Substância Ativa a C=0,25%

Condições Modificadas	Resultados (%) (A1, A2, A3)	Média (%)	S.D.	R.S.D (%)
Tal qual	98,26 98,76 101,92	99,65	1,99	1,99
Fluxo 1.6 mL/min	97,07 96,86 97,81	97,25	0,50	0,51
Fluxo 1.9 mL/min	101,21 99,66 99,98	100,28	0,82	0,82
Temperatura 25 °C	97,75 98,13 102,80	99,56	2,81	2,83
Temperatura 35 °C	98,58 102,54 108,56	103,23	5,02	4,87
Comprimento de onda 252 nm	96,35 96,70 100,53	97,86	2,32	2,37
Comprimento de onda 256 nm	97,10 96,17 99,12	97,46	1,51	1,55
Média (%)	99,33			
SD (%)	2,92			
RSD (%)	2,94			
IC_{95%} (%)	97,97 - 100,69			

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC 95% = Intervalo de Confiança a 95%;

Tabela 4.23 - Resultados do ensaio da Robustez da Impureza A

Condições Modificadas	Resultados (%) (A1, A2, A3)	Média (%)	S.D.	R.S.D (%)
Tal qual	101,61 103,12 103,30	102,67	0,92	0,90
Fluxo 1.6 mL/min	98,25 98,40 98,99	98,55	0,39	0,39
Fluxo 1.9 mL/min	100,49 100,73 101,16	100,80	0,34	0,34
Temperatura 25 °C	101,42 101,89 102,64	101,98	0,62	0,61
Temperatura 35 °C	101,24 102,27 101,66	101,72	0,52	0,51
Comprimento de onda 252 nm	101,00 101,92 100,98	100,97	0,04	0,04
Comprimento de onda 256 nm	100,94 101,85 102,86	101,88	0,96	0,95
Média (%)	101,22			
SD (%)	1,37			
RSD (%)	1,36			
IC_{95%} (%)	100,58 - 101,86			

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC 95% = Intervalo de Confiança a 95%;

Tabela 4.24 - Resultados do estudo da Robustez da Impureza H

Condições Modificadas	Resultados (%) (A1, A2, A3)	Média (%)	S.D.	R.S.D (%)
Tal qual	106,94 105,57 106,89	106,47	0,78	0,73
Fluxo 1.6 mL/min	107,18 106,03 105,97	106,39	0,68	0,64
Fluxo 1.9 mL/min	108,98 108,18 110,52	109,23	1,19	1,09
Temperatura 25 °C	102,81 104,97 104,15	103,98	1,09	1,05
Temperatura 35 °C	104,38 104,17 107,22	105,26	1,70	1,70
Comprimento de onda 252 nm	104,83 103,66 106,27	104,92	1,31	1,31
Comprimento de onda 256 nm	105,27 104,38 107,21	105,62	1,44	1,44
Média (%)	105,98			
SD (%)	1,88			
RSD (%)	1,78			
IC_{95%} (%)	105,1 - 106,86			

SD=Desvio Padrão; RSD=Desvio Padrão Relativo; IC 95% = Intervalo de Confiança a 95%;

As alterações que foram aplicadas ao método originaram valores de RSD inferiores a 10% em relação ao método original tanto para o ativo a 0,2% e 0,25%, como para a Impureza A e para a Impureza H. Os valores cumprem com os critérios de aceitação concluindo-se que o método é robusto.

Estabilidade Intra-diária do Padrão

Para o estudo da estabilidade intra-diária do padrão, foram obtidas respostas do mesmo durante 20h e comparadas com as respostas ao tempo inicial. Um padrão apresenta estabilidade se o desvio em relação às respostas iniciais apresente um RSD inferior a 3%. Na Tabela 4.25 encontra-se essas mesmas respostas e pode-se concluir que o padrão é estável durante pelo menos 20h à temperatura ambiente.

Tabela 4.25 - Estabilidade intra-diária do padrão

Solução Padrão	Substância Ativa	
Tempo (horas)	Resposta	Desvio (%)
0	187791,5	---
4	186309,5	-0,79
8	188417,5	0,33
12	185671,0	-1,12
16	184750,5	-1,62
20	184808,0	-1,59
Média	186291,3	---
RSD (%)	0,93	---

RSD=Desvio Padrão Relativo

4.1 Adequabilidade de um método como indicador de estabilidade

O método deve ser capaz de separar e detetar produtos de degradação que surjam durante as várias condições de stress aplicadas ao produto acabado e à matéria prima, a fim de avaliar a adequabilidade do método como indicador de estabilidade.

Várias amostras foram submetidas a condições de *stress* como temperatura (50°C e 90°C), humidade (85% de HR, Humidade Relativa), fotoestabilidade (500Wh/m² por cada ciclo de 12h), amostras em contacto com meio ácida (HCl 0,05N), básicas (NaOH 0,1N) e oxidativas (H₂O₂ 0,6%).

Posto isto, foi realizado um doseamento da substância ativa e por sua vez uma análise aos compostos relacionados, de forma a avaliar se o balanço de massa entre a percentagem de substância ativa após degradação e a percentagem de produtos de degradação que surgiram é coerente. Também foi avaliada a pureza do pico, de maneira a analisar se surgiram picos de degradação ao tempo de retenção da substância ativa, e que de alguma forma interferiam no doseamento da mesma.

Nas Tabelas 4.26 e 4.27 encontram-se os resultados do produto acabado e da matéria prima após exposição à luz.

Tabela 4.26 - Fotoestabilidade do produto acabado

Ciclos de exposição (h)	Compostos relacionados (%)	Doseamento do Ativo (%)	Purity Angle	Purity Thresold
0	0,687	99,45	0,068	0,246
12	0,786	98,05	0,073	0,248
24	1,005	98,23	0,067	0,244
48	1,118	98,12	0,074	0,245

Tabela 4.27 - Fotoestabilidade da matéria prima

Ciclos de exposição (h)	Compostos relacionados (%)	Doseamento do Ativo (%)	Purity Angle	Purity Thresold
0	0,289	100,67	0,057	0,244
12	0,462	99,80	0,063	0,243
24	0,533	99,26	0,069	0,244
48	0,549	98,58	0,072	0,246

Verificou-se que as amostras de produto acabado e de matéria prima sujeitas aos ciclos de 12h de luz com uma potência de 500Wh/m² não apresentam uma diminuição do doseamento de ativo significativo podendo afirmar que o ativo em estudo não é fotossensível.

Nas Tabelas 4.28 e 4.29 encontram-se os resultados das degradações térmicas, ácidas, básicas e oxidativas do produto acabado e da matéria prima.

Tabela 4.28 - Resumo das degradações térmicas, ácidas, básicas e oxidativas do produto acabado

Condições de stress	Compostos relacionados (%)	Doseamento do Ativo (%)	Purity Angle	Purity Thresold
50°C, 3 dias	0,643	98,73	0,076	0,247
50°C, 7 dias	0,707	99,38	0,067	0,245
90°C, 3 dias	2,398	96,69	0,091	0,245
90°C, 7 dias	20,831	77,65	0,128	0,241
85% HR, 3 dias	0,630	98,23	0,192	0,278
85% HR, 3 dias	0,727	97,15	0,080	0,248
HCl 0,05N, 3h	9,547	93,95	0,167	0,273
NaOH 0,1N, 3h	0,439	95,24	0,221	0,292
H ₂ O ₂ 0,6%, 3h	1,180	91,65	0,161	0,261

Tabela 4.29 - Resumo das degradações térmicas, ácidas, básicas e oxidativas da matéria prima

Condições de stress	Compostos relacionados (%)	Doseamento do Ativo (%)	Purity Angle	Purity Thresold
50°C, 3 dias	0,344	100,49	0,056	0,235
50°C, 7 dias	0,363	99,75	0,054	0,234
90°C, 3 dias	0,333	99,30	0,061	0,236
90°C, 7 dias	0,400	96,67	0,044	0,245
85% HR, 3 dias	0,298	99,02	0,065	0,245
85% HR, 3 dias	0,309	99,80	0,072	0,248
HCl 0,05N, 3h	5,770	86,22	0,059	0,240
NaOH 0,1N, 3h	0,341	99,68	0,202	0,286
H ₂ O ₂ 0,6%, 3h	0,431	96,71	0,147	0,243

Pela observação dos resultados obtidos, comprovou-se que o método é adequado para a monitorização da estabilidade do produto pois nas amostras em que se detetou a degradação da substância ativa, verificou-se o aumento correspondente aos produtos de degradação.

Neste ensaio de degradação forçada, a interconversão da substância ativa é claramente observada em degradação ácida e básica. Na degradação ácida, verifica-se um enorme aumento no teor de impureza H e uma degradação da substância ativa (Figura B.32 e C.32 dos Anexos). Por outro lado, na degradação básica não se verifica uma diminuição do doseamento da substância ativa e o teor de impureza H é ínfimo.

A substância ativa em estudo degrada mais em condições de temperatura extremas, 90°C e 7 dias no produto acabado, e em presença com um meio ácido na matéria prima, o que vai de encontro a outras validações de degradações realizadas [16,33].

Nos anexos B e C é possível de verificar com mais detalhe os cromatogramas obtidos no estudo das degradações.

Neste tipo de ensaio é possível de ter uma caracterização mais detalhada do pico do ativo com a utilização de um detetor DAD. Neste método foi utilizada uma gama de comprimento de onda desde 220nm até 400nm de modo a verificar o espectro de absorvâncias dos picos (exemplo na Figura 4.21), a pureza dos mesmos e ainda representações gráficas em 3D (exemplo na Figura 4.22).

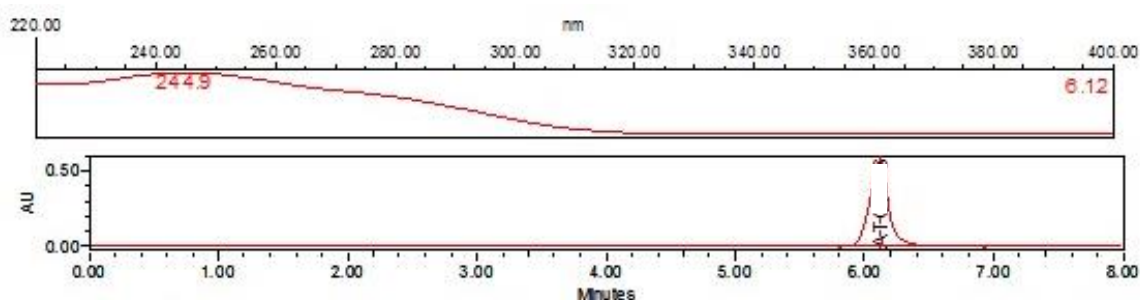


Figura 4.21 – Exemplo de um espectro de absorvância obtidos para o pico da substância ativa

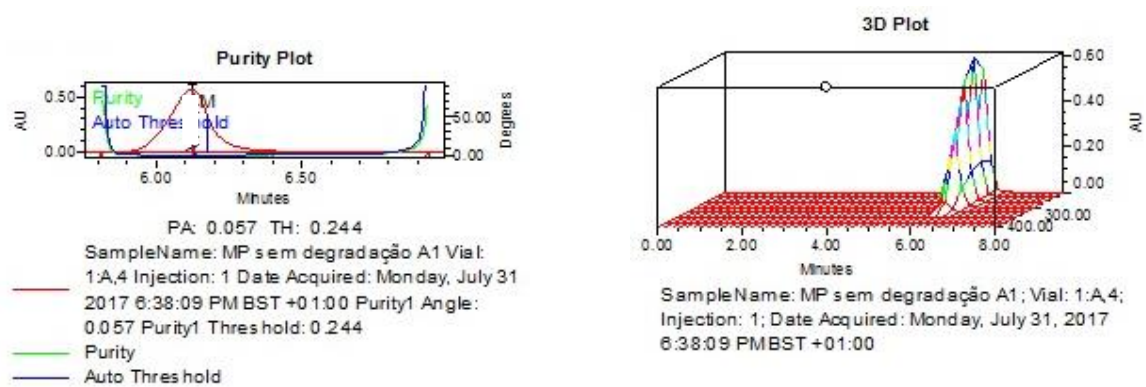


Figura 4.22 - Gráfico representativo da pureza do pico e representação tridimensional do mesmo

5 Conclusões e Propostas de Trabalho Futuro

O método de compostos relacionados na análise de um medicamento de ação cardiovascular foi validado na sua totalidade seguindo os parâmetros da ICH, *International Conference on Harmonization*.

O método mostrou-se adequado para identificação e quantificação de impurezas ou compostos relacionados da substância ativa contida no medicamento a uma concentração de trabalho de 800 µg/mL. Mostrou-se específico na medida em que todos os componentes do sistema caracterizados por um tempo de retenção bem definido e característico dos mesmos. Verificou-se que para a Impureza H que ocorre a interconversão da mesma na substância ativa (característica intrínseca do tipo de moléculas de ação cardiovascular). No âmbito da validação, as amostras de Impureza H foram preparadas de forma isolada da substância ativa de modo a não influenciar resultados quando esta era analisada.

De modo a contornar esta interconversão usando o método analítico em causa, é importante que as amostras do medicamento sejam preparadas e injetadas de imediato e de forma isolada da substância ativa. Uma outra forma de contrariar a interconversão referida, seria o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação da impureza H em que, uma das alterações possíveis de realizar ao método, passaria pela diminuição do pH da fase móvel para um pH inferior ao pKa da interconversão (pKa=4,33).

O método mostrou também ser preciso em todos os seus aspetos em que na repetibilidade do método os valores de RSD obtidos foram de 3,98% e 3,36% para o ativo à concentração de especificação de 1,6µg/mL (C=0,2%) e 2,0µg/mL (C=0,25%) respetivamente, e 2,08% e 0,96% para a Impureza A e H, respetivamente; relativamente à precisão intermédia, os valores de RDS foram 2,79% e 2,57% para o ativo à concentração de especificação de 0,2% e de 0,25%, RDS de 2,47% para a Impureza A e 1,38% para a Impureza H.

O método provou ser linear para o ativo a 0,2% (C=1,6µg/mL) e 0,25% (C=2,0µg/mL) da concentração de trabalho, para a Impureza A e H uma vez que os coeficientes de correlação (r) e determinação (r^2) foram superiores a 0,998 e o intervalo de confiança de 95% da reta contém o valor zero.

Através da linearidade obteve-se os Limites de Detecção e Quantificação para a substância ativa ($LD=0,160 \mu\text{g/mL}$ e $LQ=0,320 \mu\text{g/mL}$), Impureza A ($LD=0,200 \mu\text{g/mL}$ e $LQ=0,400 \mu\text{g/mL}$) e Impureza H ($LD=0,095 \mu\text{g/mL}$ e $LQ=0,287 \mu\text{g/mL}$).

A exatidão do método foi demonstrada através da percentagem de recuperação dos analitos, sendo esta de 100,10% e 101,56% para o ativo a $C=0,2\%$ e a $C=0,25\%$ respetivamente, uma percentagem de 97,61% para a Impureza A e de 106,15% para a Impureza H.

Ainda provou ser robusto mantendo respostas analíticas equivalentes quando foram submetidas pequenas alterações à temperatura da coluna (25°C e 35°C), comprimento de onda (252 nm e 256 nm) e fluxo ($1,6 \text{ mL/min}$ e $1,9 \text{ mL/min}$) demonstrou valores de RDS de 1,49% para o ativo a $C=0,2\%$, 2,94% para o ativo a $C=0,25\%$, 1,36% para a Impureza A e RDS de 1,78% para a Impureza H.

Verificou-se também que o método é adequado como indicador de estabilidade pois a diminuição do teor da substância ativa devido às degradações forçadas foi compensada pelo aumento de produtos de degradação, originando um balanço de massas coerente durante o processo. A via que originou maior degradação no produto acabado foi a 90°C durante 7 dias e na matéria prima correspondeu à hidrólise ácida.

Conclui-se que o método se encontra validado e pode ser aplicado em análises de controlo de qualidade do medicamento.

Referências Bibliográficas

- [1] «Colesterol», *Instituto Nacional de Cardiologia Preventiva*, 2010. [Em linha]. Disponível em: <http://www.incp.pt/conselhos/sobre-o-colesterol>. [Acedido: 27-Jul-2017].
- [2] «Cardiovascular disease», *World Health Organization*, 2017. [Em linha]. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. [Acedido: 19-Set-2017].
- [3] «Tecnimede Group». [Em linha]. Disponível em: <http://www.tecnimede.com/>. [Acedido: 24-Abr-2017].
- [4] «ISO 9001 - Certificação - Sistemas de gestão na Qualidade». [Em linha]. Disponível em: <http://www.sgs.pt/pt-PT/Health-Safety/Quality-Health-Safety-and-Environment/Quality/Quality-Management-Systems/ISO-9001-Certification-Quality-Management-Systems.aspx>. [Acedido: 18-Abr-2017].
- [5] European Pharmacopoeia, «2.2.46. Chromatographic Separation Techniques», *Eur. Pharmacop. 5.0*, pp. 69–73, 2004.
- [6] R. B. Chust, «Introdução Cromatografia de Líquidos», *Bol. SPQ*, pp. 43–54, 1990.
- [7] A. P. Karmacharya, «Validation of a Method for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Water», *Universidade do Algarve*, 2015.
- [8] A. M. Sabir, M. Moloy, e P. S. Bhasin, «Hplc Method Development and Validation: a Review», *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 4, n. 4, pp. 39–46, 2016.
- [9] F. M. Lanças, «Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária : até onde ?», *Scientia Chromatographica*, vol. 3, n. 1, pp. 17–23, 2011.
- [10] L. Trojer, A. Greiderer, C. P. Bisjak, W. Wieder, N. Heigl, e C. W. Huck, *Handbook of HPLC*. .
- [11] Agilent Technologies, «The LC Handbook, Guide to LC Columns and Method Development», 2016, pp. 28–98.
- [12] L. F. M. Coutinho e F. M. Lanças, «Cromatografia Líquida Capilar1. Principais

- Características da Técnica», *Sci. Chromatogr.*, vol. 3, n. 2, pp. 115–130, 2011.
- [13] V. Ravichandran, S. Shalini, K. M. Sundram, e H. Rajak, «Validation of analytical methods - Strategies & importance», *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 2, n. SUPPL. 3, pp. 18–22, 2010.
- [14] B. J. Vaghela, R. Kayastha, N. Bhatt, N. Pathak, e D. Rathod, «Development and validation of dissolution procedures», *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 1, n. 3, pp. 50–56, 2011.
- [15] «International Conference On Harmonisation». [Em linha]. Disponível em: <http://www.ich.org/about/mission.html>. [Acedido: 10-Ago-2017].
- [16] B. Nigović, A. Mornar, e M. Sertić, «A Review of Current Trends and Advances in Analytical Methods for Determination of Statins: Chromatography and Capillary Electrophoresis», em *World's largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher*, 2012.
- [17] Ich, «ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology», *Int. Conf. Harmon.*, vol. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.
- [18] A. Paper e C. Procedure, «〈 621 〉 Chromatography», vol. 1, n. 2.
- [19] United State Pharmacopoeia, «Validation of Compendial Procedures», *United States Pharmacopoeia XXXVII Natl. Formul. XXXII*, pp. 1–5, 2014.
- [20] «ISO/IEC 17025 - Sistemas de gestão de laboratório». [Em linha]. Disponível em: <http://www.sgs.pt/pt-PT/Training-Services/Industry-Based-Training/Life-Sciences-Training/Laboratory-Management/ISO-IEC-17025-Laboratory-Management-Systems-Awareness-Training.aspx>. [Acedido: 21-Mar-2017].
- [21] Z. L. Pereira e J. G. Requeijo, «Qualidade: Planeamento e Controlo estatístico de processos», 1^a., Prefácio, Ed. Lisboa, 2008, pp. 111–114.
- [22] G. R. 13, «Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Instituto Português da Qualidade», 2000.
- [23] P. Furrer, «The central role of excipients in drug formulation», *European Pharmaceutical Review*, 2013. [Em linha]. Disponível em: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/18434/the-central-role->

of-excipients-in-drug-formulation-2/. [Acedido: 10-Set-2017].

- [24] Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B. G. M. Vandeginste, e D. L. Massart, «Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation», *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 24, n. 5–6, pp. 723–753, 2001.
- [25] N. Health e S. Agency, «Guideline for obtainment of the degradation profile, and identification and qualification of degradation products in drugs», *Natl. Heal. Surveill. Agency Guid.*, 2016.
- [26] Z. Zaheer, M. N. Farooqui, e a a M. a G. Nikalje, «Stability-indicating high performance liquid chromatographic determination of atorvastatin calcium in pharmaceutical dosage form», *African J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 2, n. 10, pp. 204–210, 2008.
- [27] ICH Expert Working Group, «ICH Guideline Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products», *Int. Conf. Harmon.*, n. February, p. 24, 2003.
- [28] M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, e Y. K. Agrawal, «Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review», *J. Pharm. Anal.*, vol. 4, n. 3, pp. 159–165, 2014.
- [29] ICH, «Stability Testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B», *Int. Conf. Harmon.*, n. February, p. 24, 2003.
- [30] M. Hoffmann e M. Nowosielski, «DFT study on hydroxy acid-lactone interconversion of statins: the case of atorvastatin.», *Org. Biomol. Chem.*, vol. 6, n. 19, pp. 3527–31, 2008.
- [31] H. M. Hafez, A. A. Elshanawany, L. M. Addelaziz, e M. S. Mohram, «Development of a Stability-Indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Atorvastatin Calcium in tablets», *Austin J. Anal. an Pharm. Chem.*, vol. 1, n. 6, pp. 1–11, 2014.
- [32] L. Nováková *et al.*, «Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin.», *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, n. 22, pp. 2093–2103, 2009.
- [33] D. N. Vora e a. a. Kadav, «Validated Ultra HPLC Method for the Simultaneous

Determination of Atorvastatin, Aspirin, and their Degradation Products in Capsules», *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 31, n. 18, pp. 2821–2837, 2008.

- [34] B. Nigović, A. Mornar, e M. Sertić, «Review of Current Trends and Advances in Analytical Methods for Determination of Statins : Chromatography and Capillary Electrophoresis», em *World's largest Science , Technology & Medicine*, 2012, pp. 385–393.
- [35] S. A. Hassan, E. S. Elzanfaly, S. B. A. El-Zeany, e M. Y. Salem, «Development and validation of HPLC and CE methods for simultaneous determination of amlodipine and atorvastatin in the presence of their acidic degradation products in tablets», *Acta Pharm.*, vol. 66, n. 4, pp. 479–490, 2016.
- [36] «How do small particle size columns increase sample throughput?» [Em linha]. Disponível em: http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-Library/Pharmaceutical/pharm_A016. [Acedido: 02-Set-2017].
- [37] L. Group, «High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)». [Em linha]. Disponível em: http://www.lindeus.com/en/industries/laboratories/analysis_and_measurement/high-performance_liquid_chromatography/index.html. [Acedido: 19-Ago-2017].

Anexo A: Cromatogramas relativos à Impureza H

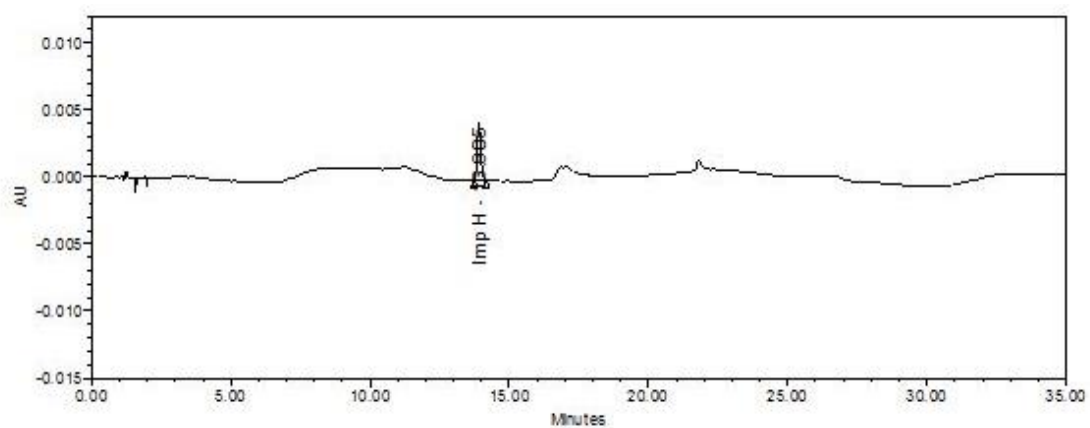


Figura A.1 - Cromatograma da solução Impureza H logo após a preparação da solução

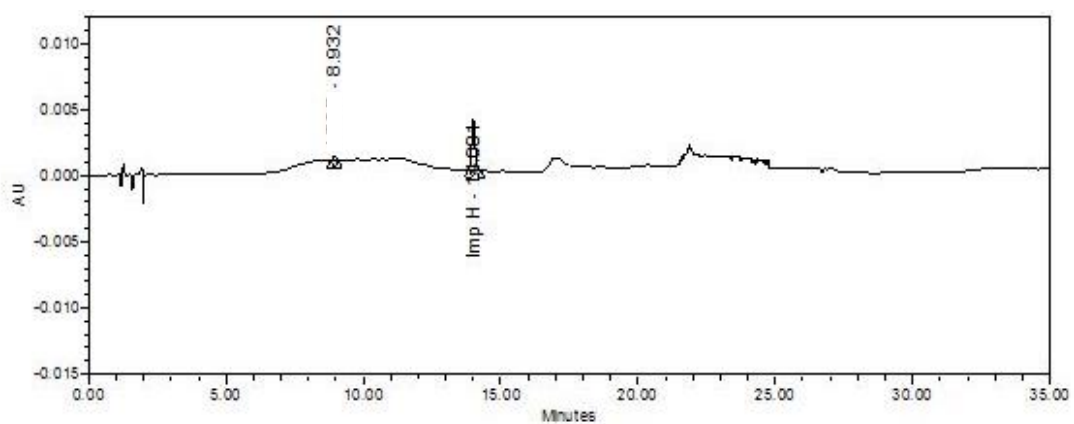


Figura A.2 - Cromatograma da solução Impureza H horas após a preparação da solução

Anexo B: Cromatogramas do ensaio de degradações do Produto Acabado

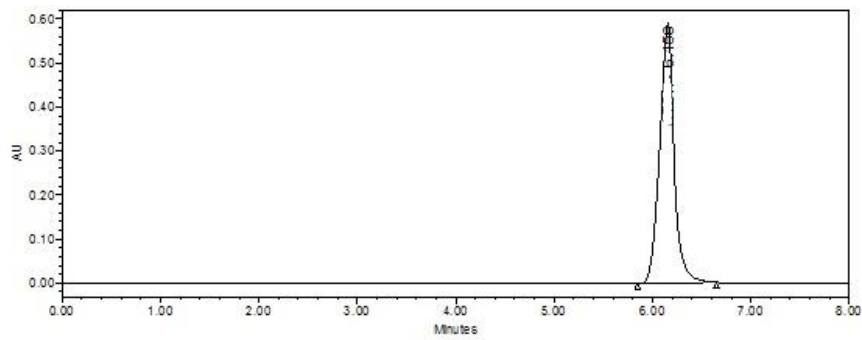


Figura B.1 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado sem degradação

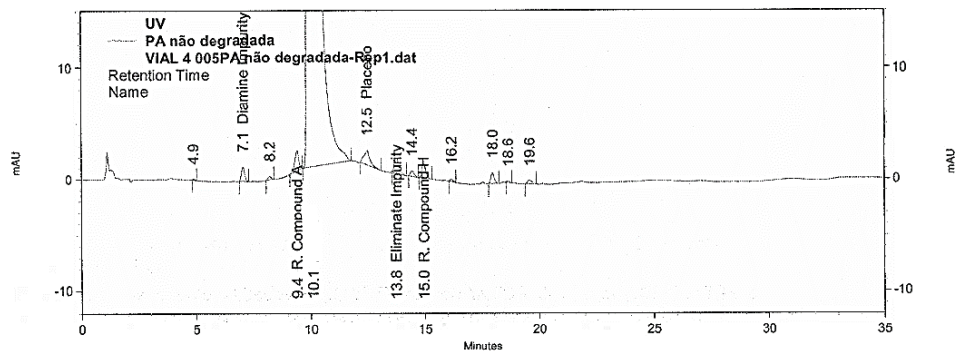


Figura B.2 - Cromatograma do sistema de Compostos Relacionados (CR) do produto acabado sem degradação

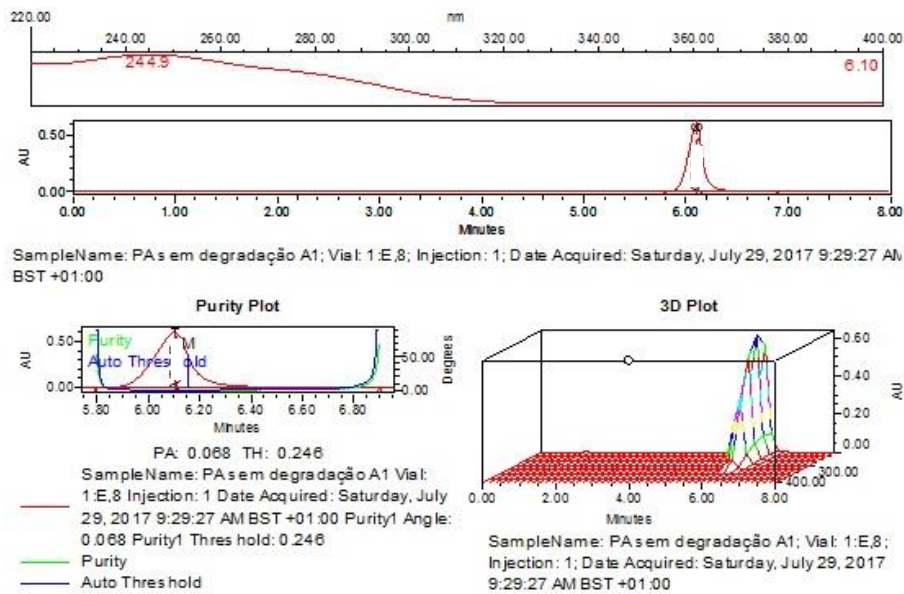


Figura B.3 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado sem degradação

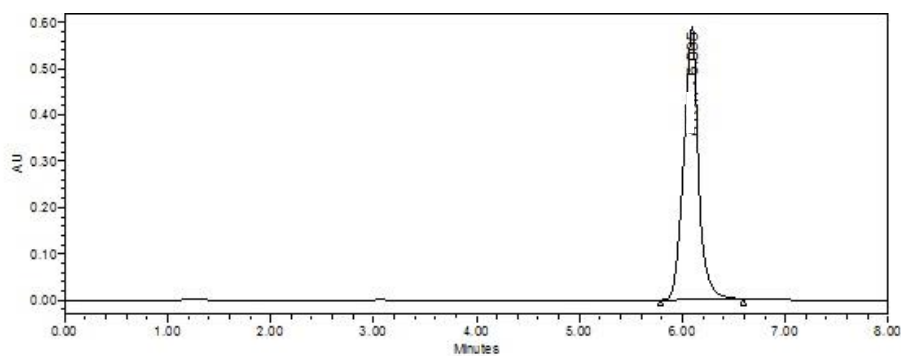


Figura B.4 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio de *suntest* a 12h

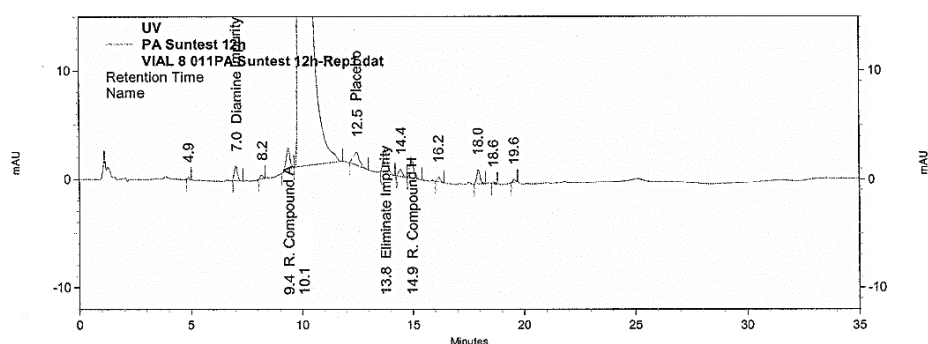


Figura B.5 - Cromatograma do sistema de CR do produto acabado do ensaio de *suntest* a 12h

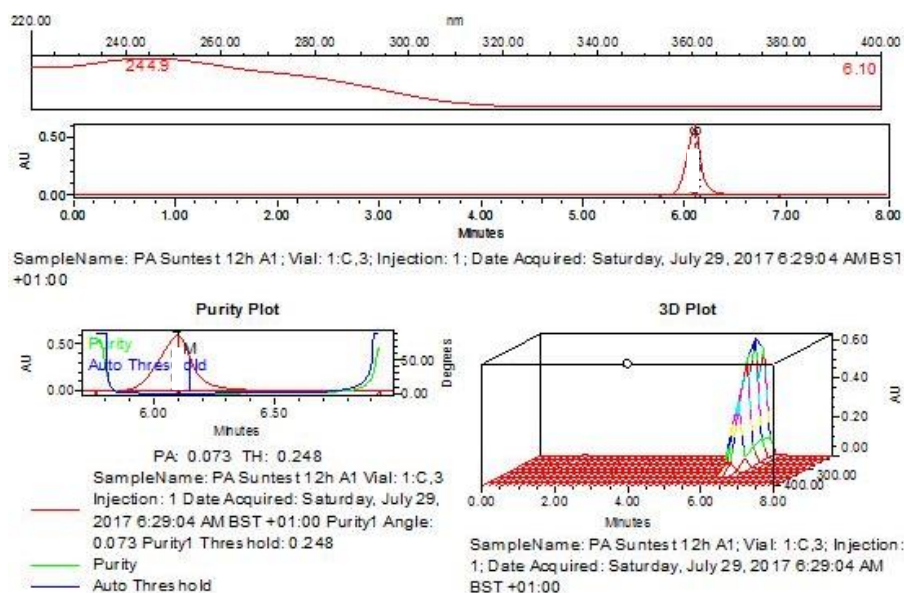


Figura B.6 – Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio de *suntest* a 12h

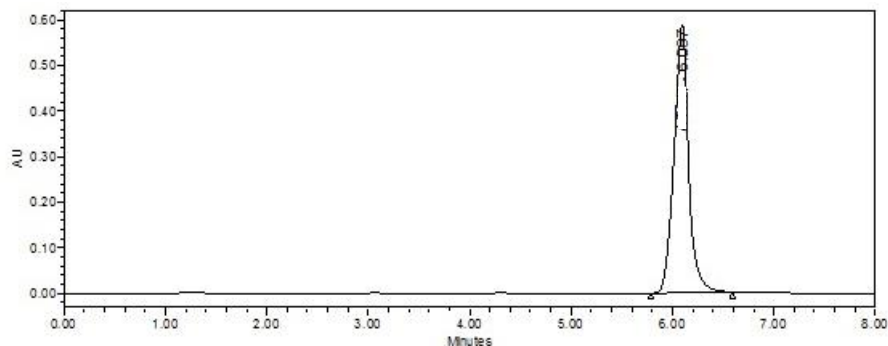


Figura B.7 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio de *suntest* a 24h

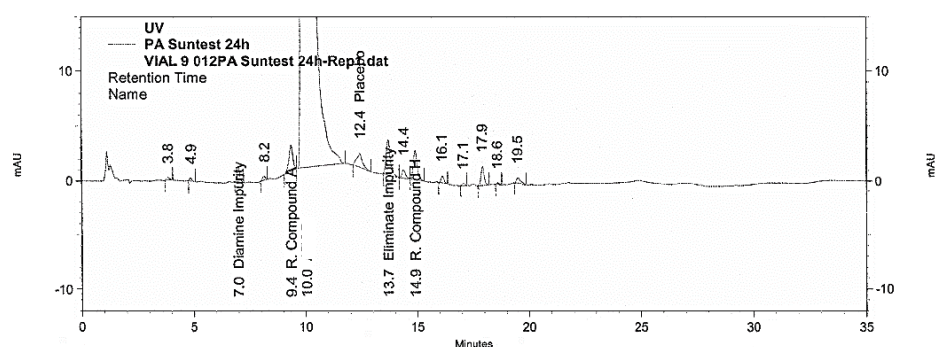


Figura B.8 - Cromatograma do sistema de CR do produto acabado do ensaio de *suntest* a 24h

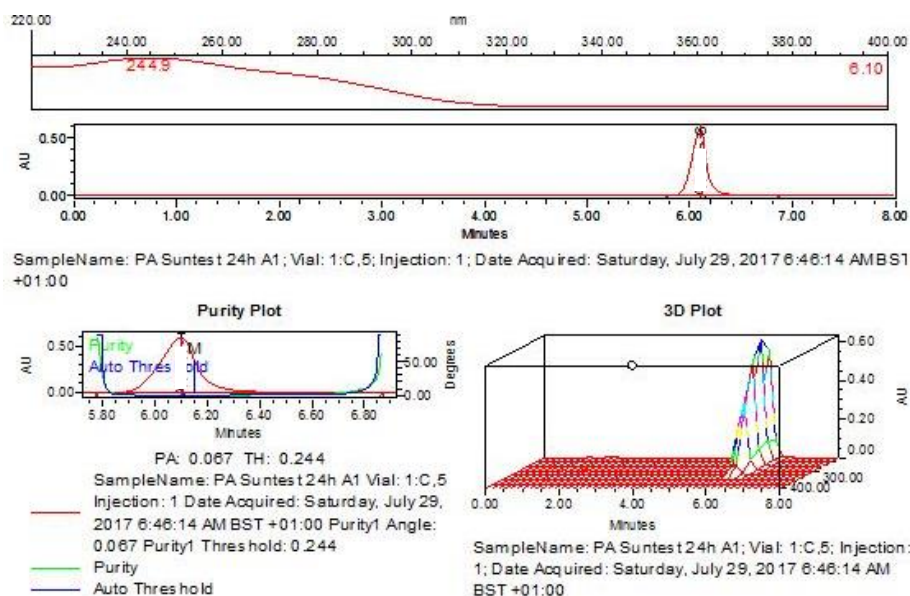


Figura B.9 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio de *suntest* a 24h

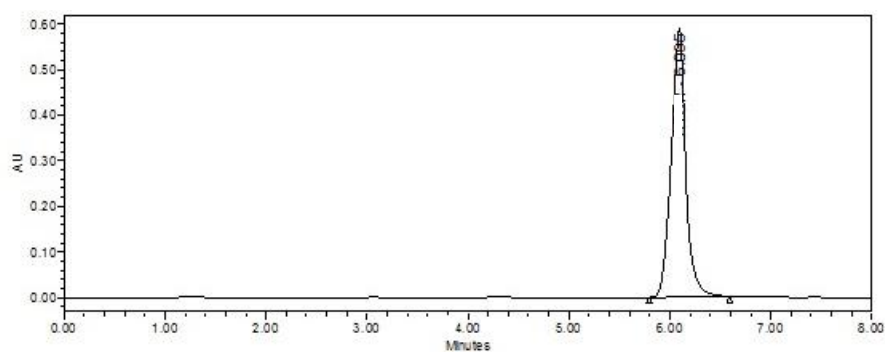


Figura B.10 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio de *suntest* a 48h

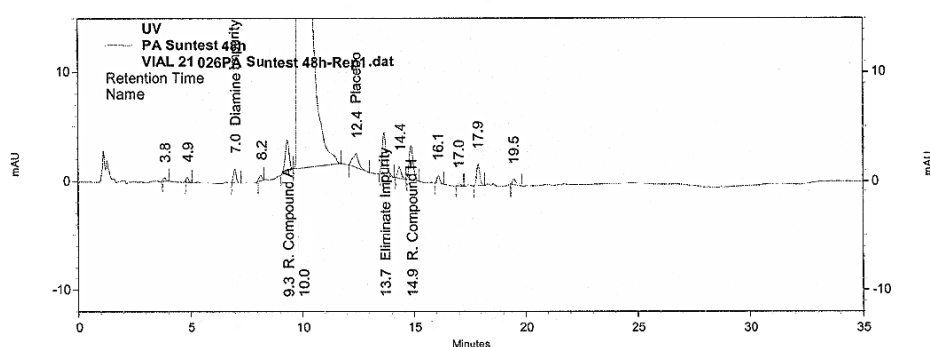


Figura B.11 - Cromatograma do sistema de CR do produto acabado do ensaio de *suntest* a 48h

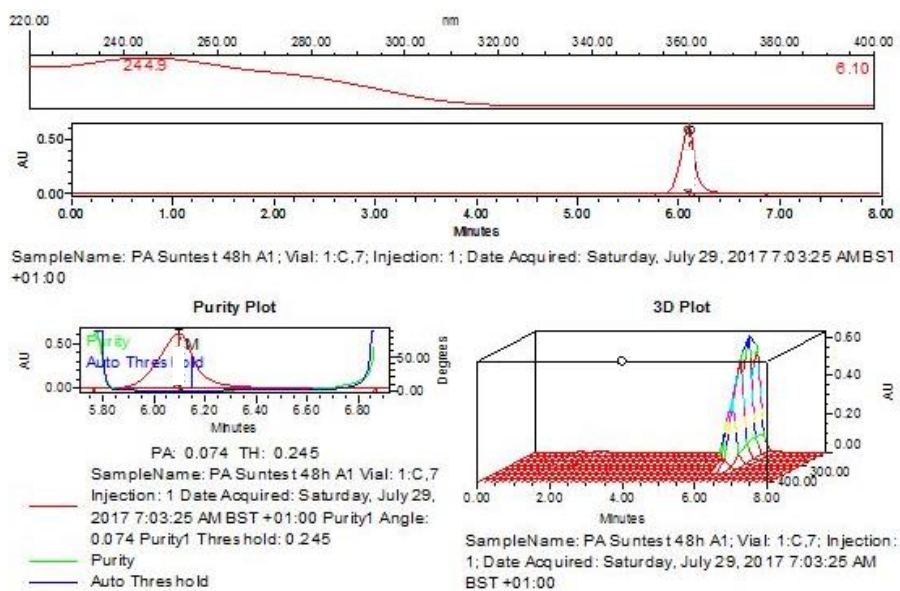


Figura B.12 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio de *suntest* a 48h

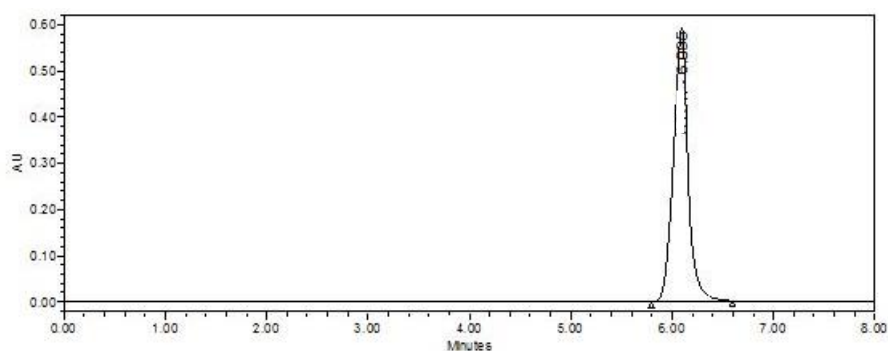


Figura B.13 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio a 50°C durante 3 dias

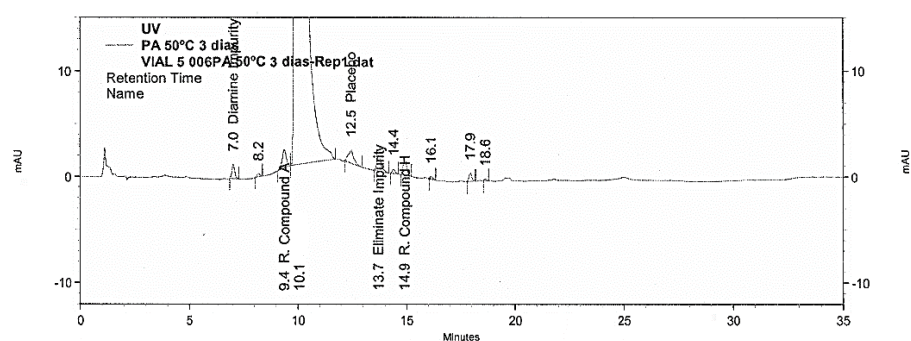


Figura B.14 - Cromatograma do sistema de CR do produto acabado do ensaio a 50°C durante 3 dias

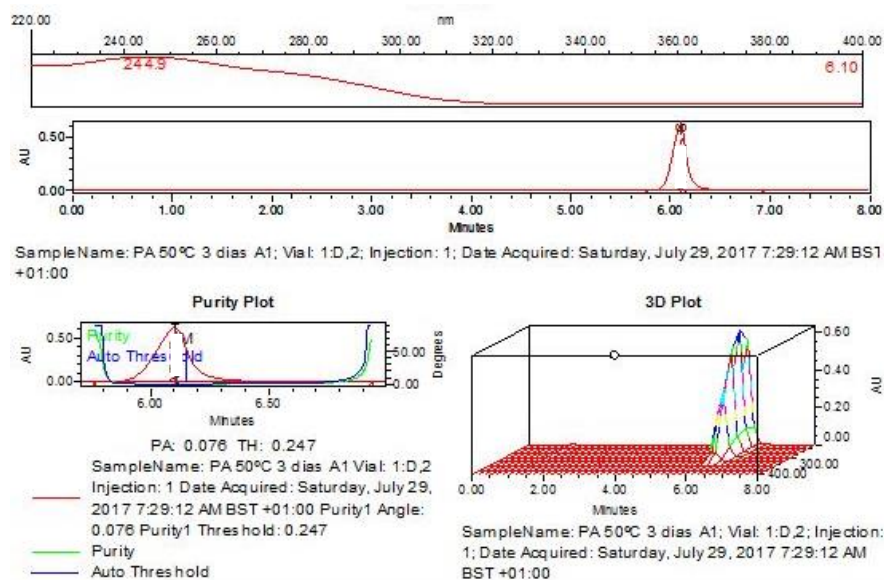


Figura B.15 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio a 50°C durante 3 dias

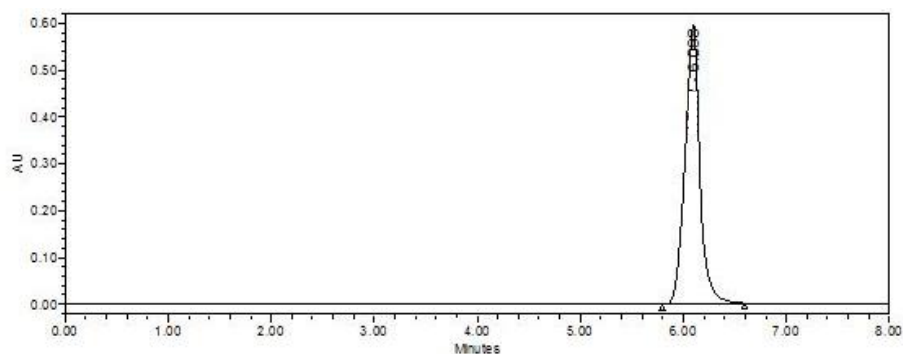


Figura B.16 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio a 50°C durante 7 dias

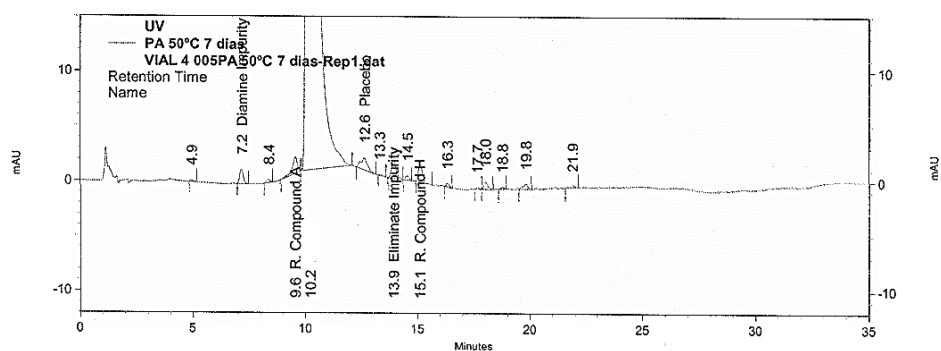


Figura B.17 - Cromatograma do sistema de CR do produto acabado do ensaio a 50°C durante 7 dias

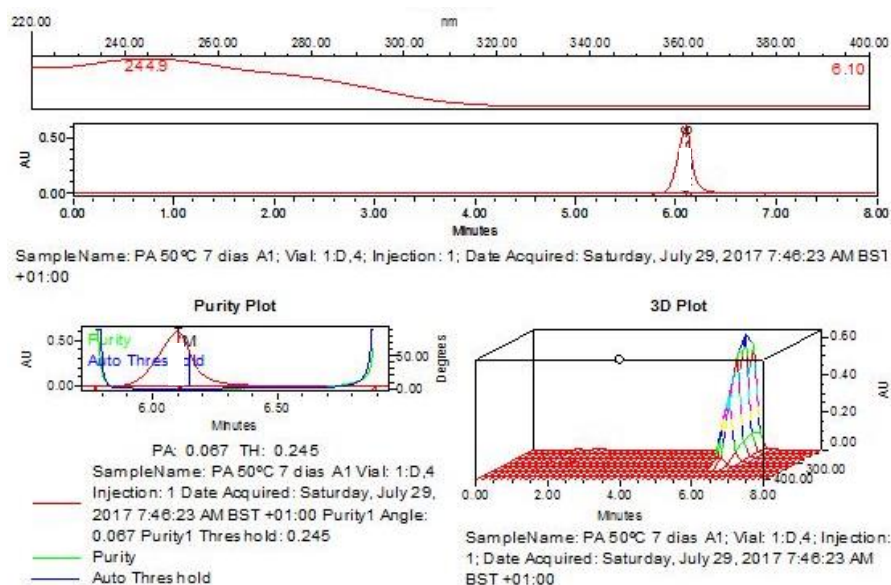


Figura B.18 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio a 50°C durante 7 dias

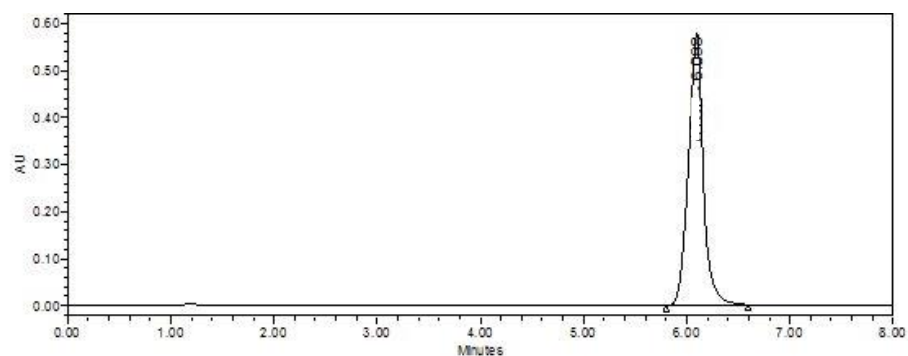


Figura B.19 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio a 90°C durante 3 dias

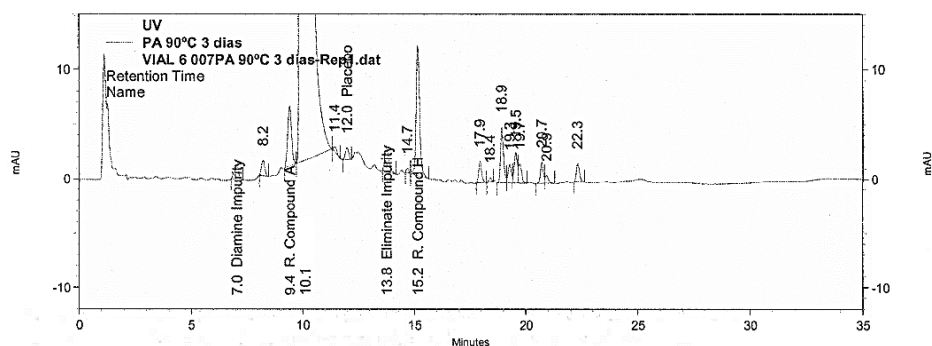


Figura B.20 - Cromatograma do sistema de CR do produto acabado do ensaio a 90°C durante 3 dias

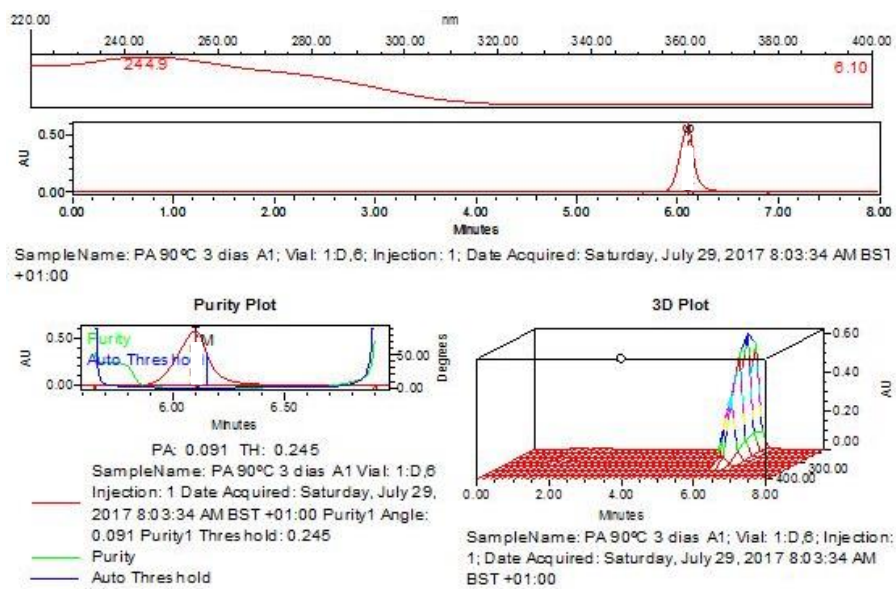
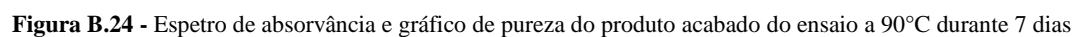
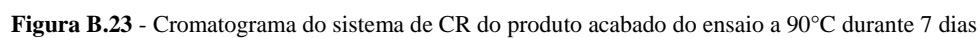
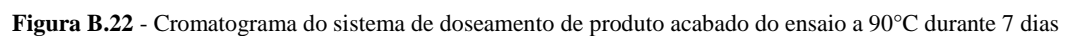


Figura B.21 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio a 90°C durante 3 dias



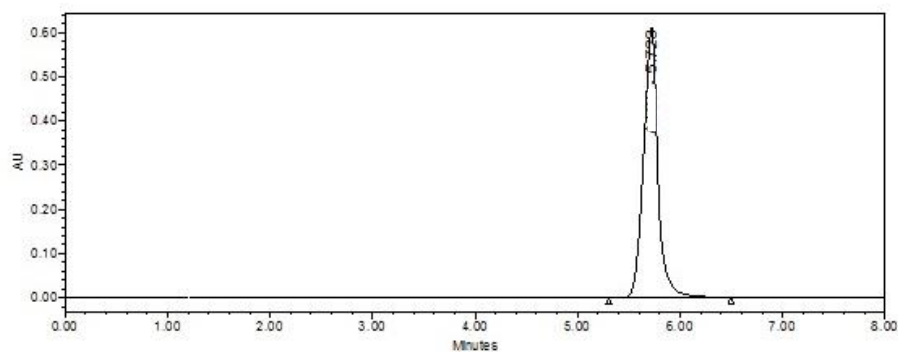


Figura B.25 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio a 85%HR durante 3 dias

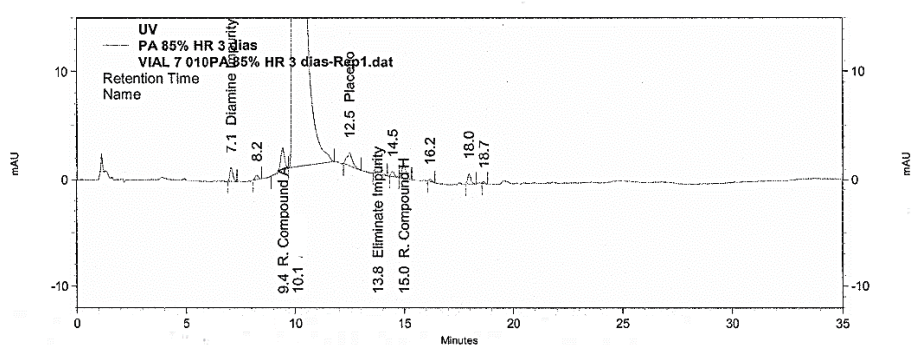


Figura B.26 - Cromatograma do sistema de CR do produto acabado do ensaio a 85%HR durante 3 dias

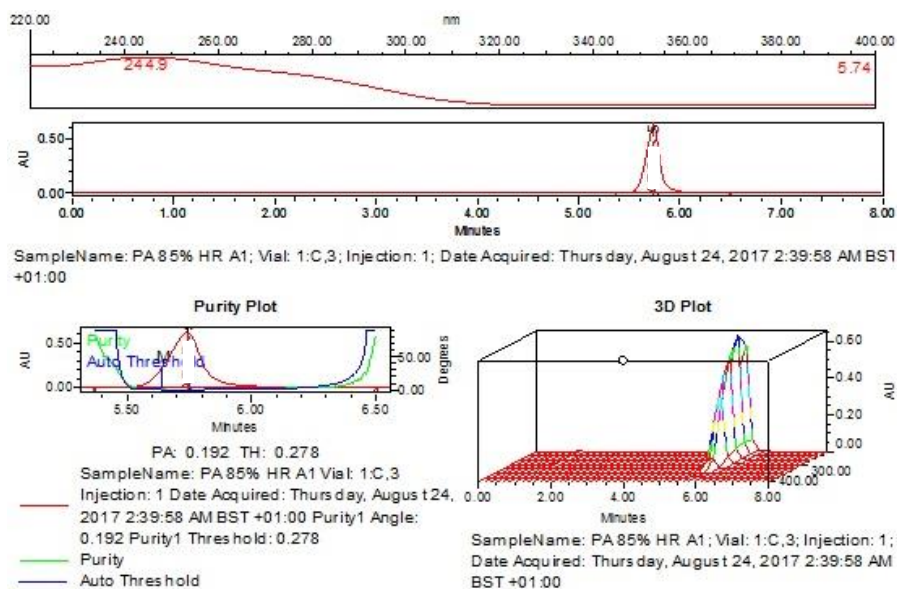


Figura B.27 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio a 85%HR durante 3 dias

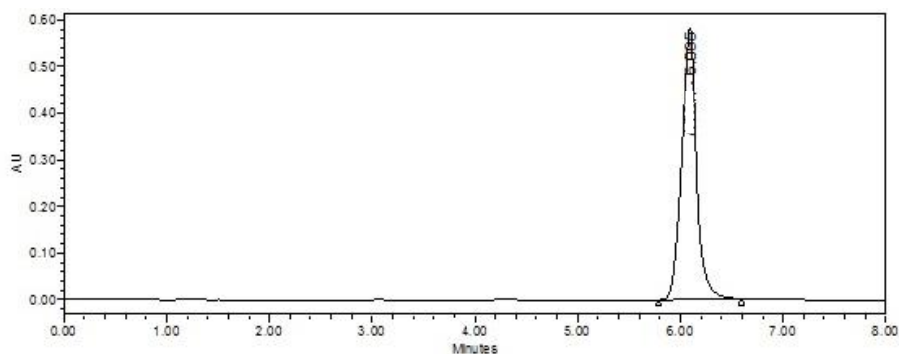


Figura B.28 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio a 85%HR durante 7 dias

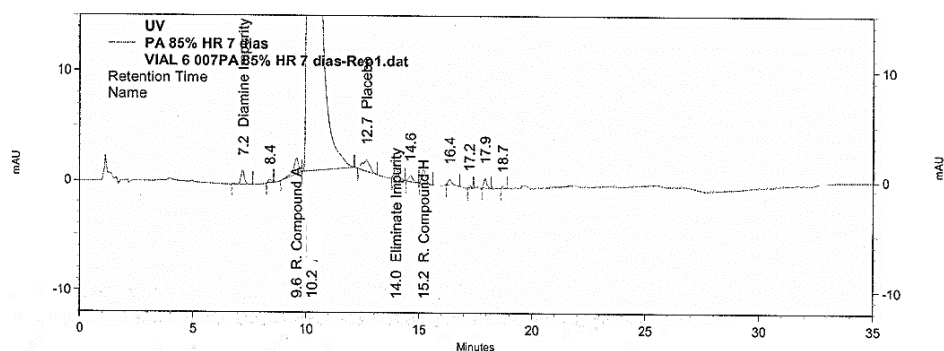


Figura B.29 - Cromatograma do sistema de CR do produto acabado do ensaio a 85%HR durante 7 dias

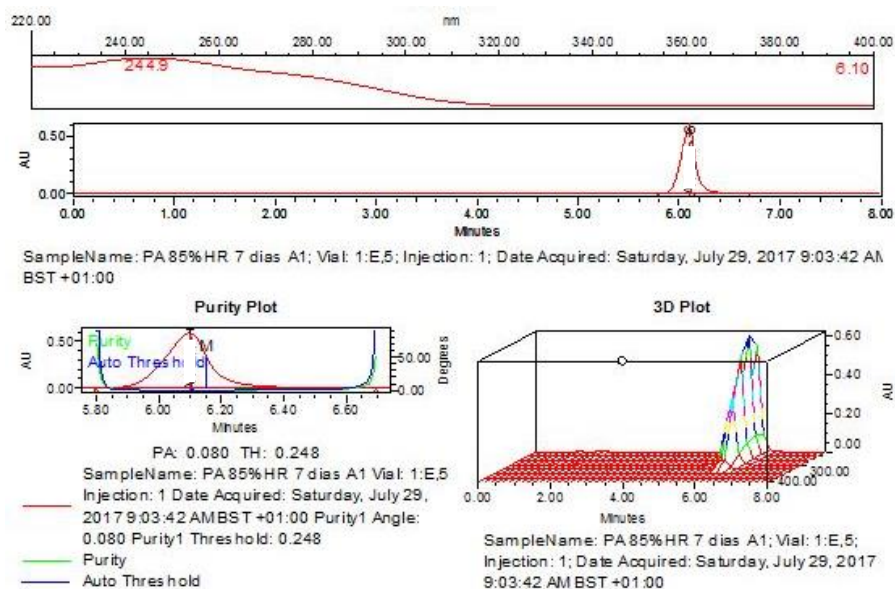


Figura B.30 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio a 85%HR durante 7 dias

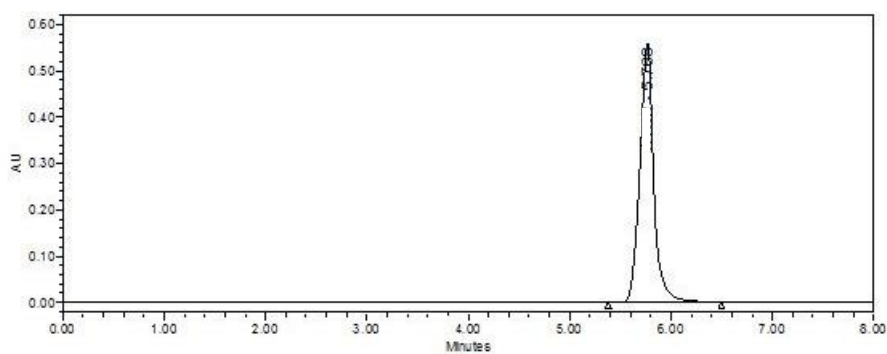


Figura B.31 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio com meio ácido (HCl 0.05N) às 3h

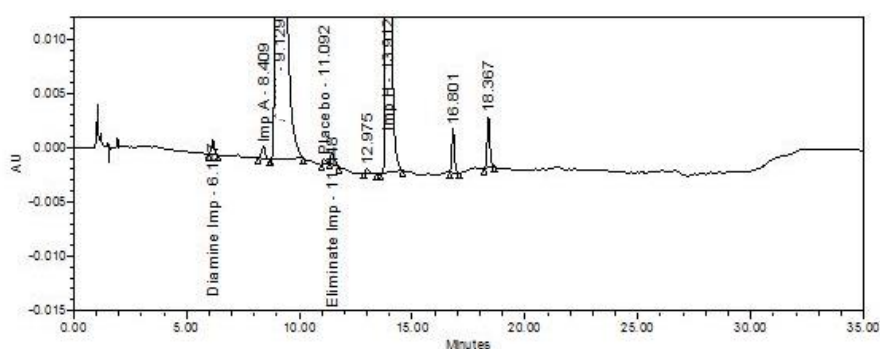


Figura B.32 - Cromatograma do sistema de CR de produto acabado do ensaio com meio ácido (HCl 0.05N) às 3h

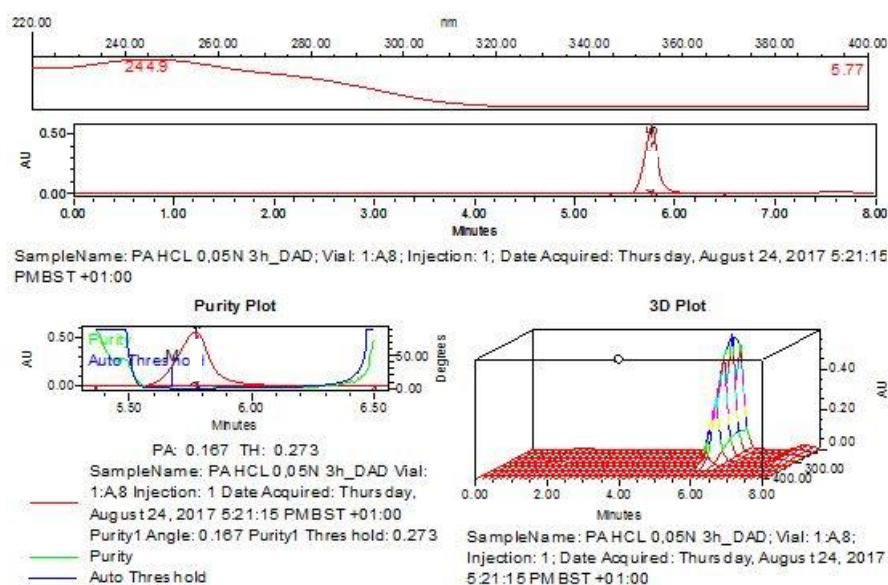


Figura B.33 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio com meio ácido (HCl 0.05N) às 3h

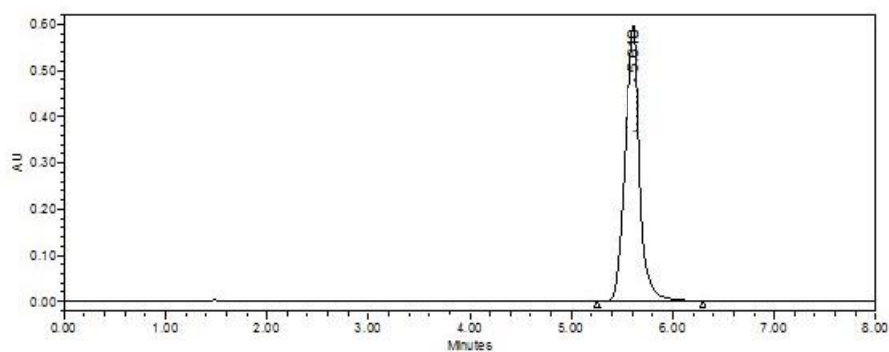


Figura B.34 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio com meio básico (NaOH 0.1N) às 3h

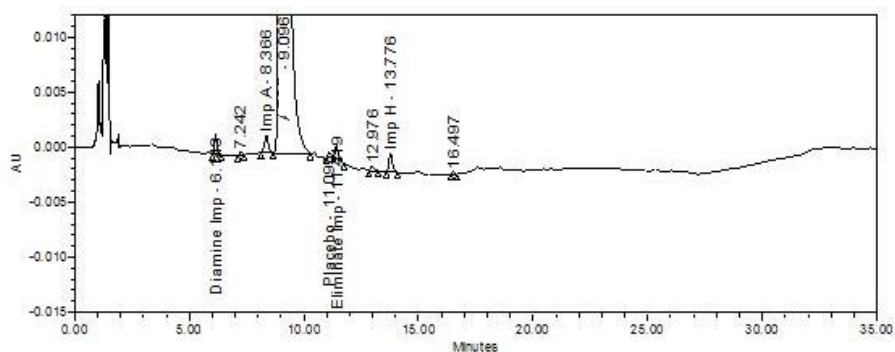


Figura B.35 - Cromatograma do sistema de CR de produto acabado do ensaio com meio básico (NaOH 0.1N) às 3h

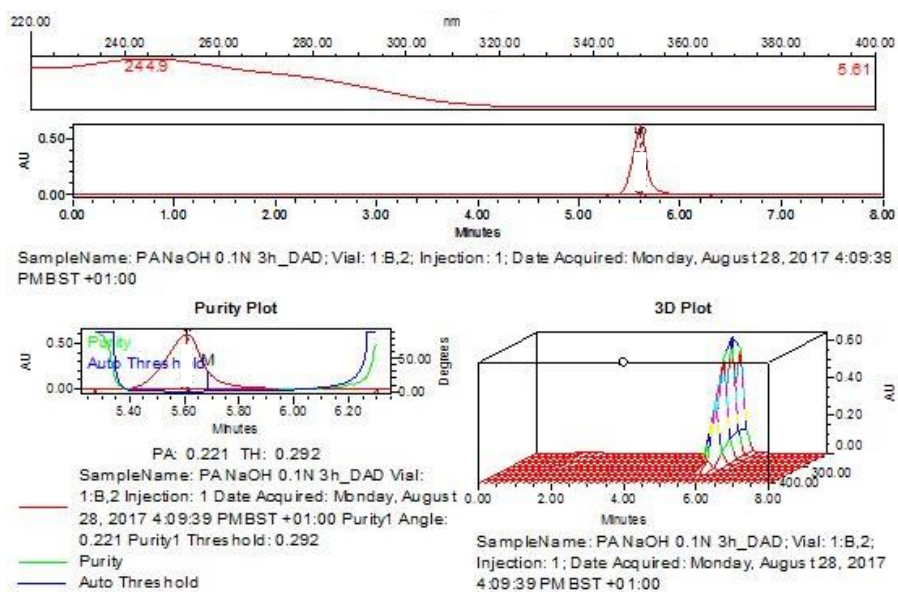


Figura B.36 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio com meio básico (NaOH 0.1N) às 3h

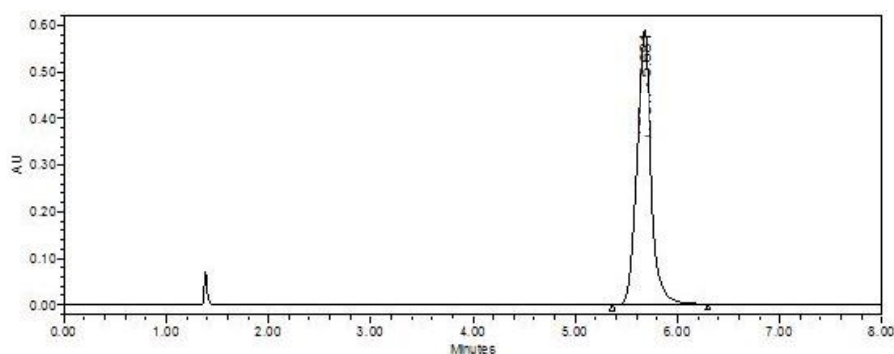


Figura B.37 - Cromatograma do sistema de doseamento de produto acabado do ensaio com meio oxidativo (H₂O₂ 0.6%) às 3h

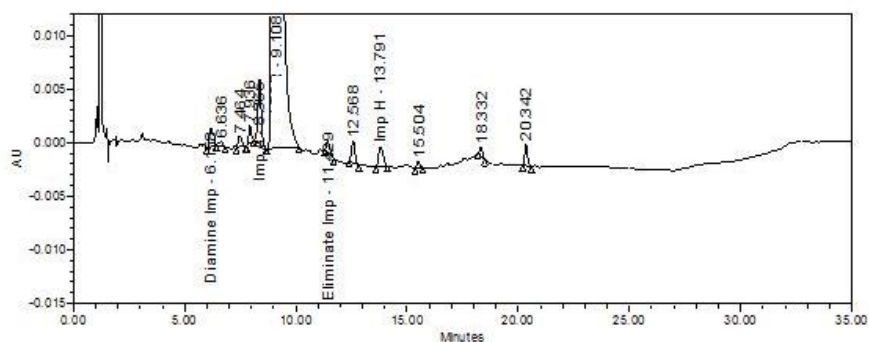


Figura B.38 - Cromatograma do sistema de CR de produto acabado do ensaio com meio oxidativo (H₂O₂ 0.6%) às 3h

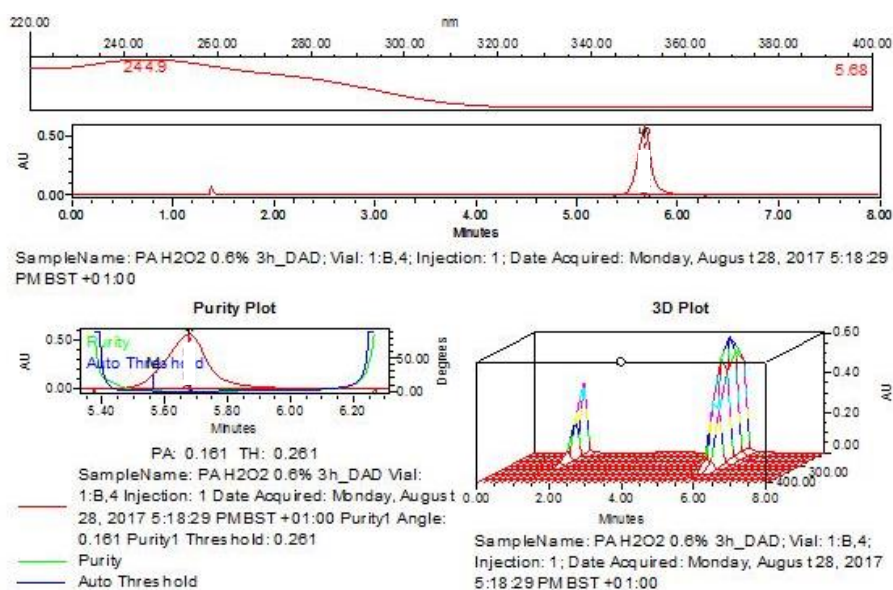


Figura B.39 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza do produto acabado do ensaio com meio oxidativo (H₂O₂ 0.6%) às 3h

Anexo C: Cromatogramas do ensaio de degradações da Matéria Prima

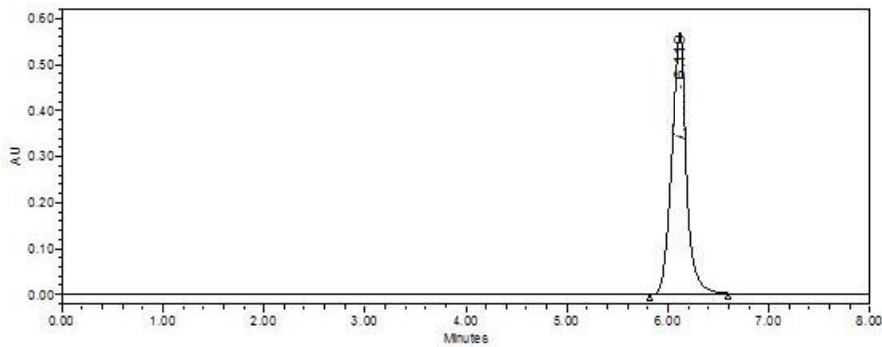


Figura C.1 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima sem degradação

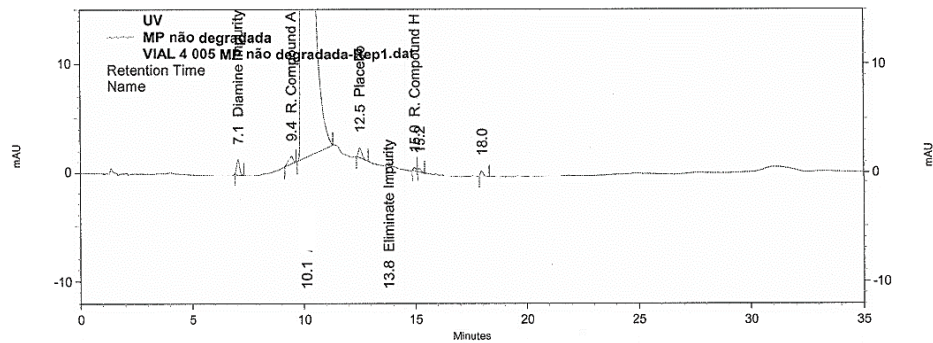


Figura C.2 - Cromatograma do sistema de CR da matéria prima sem degradação

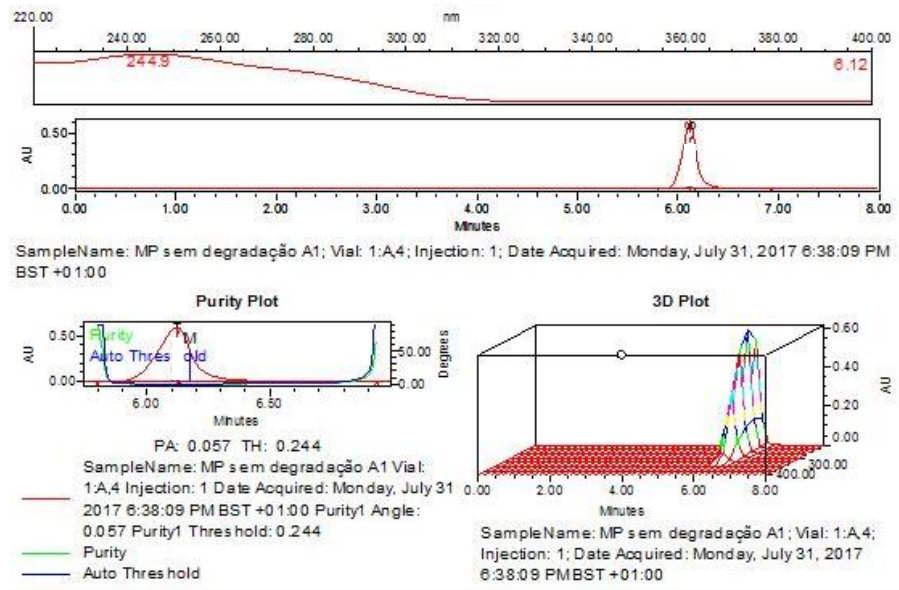


Figura C.3 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza da matéria prima sem degradação

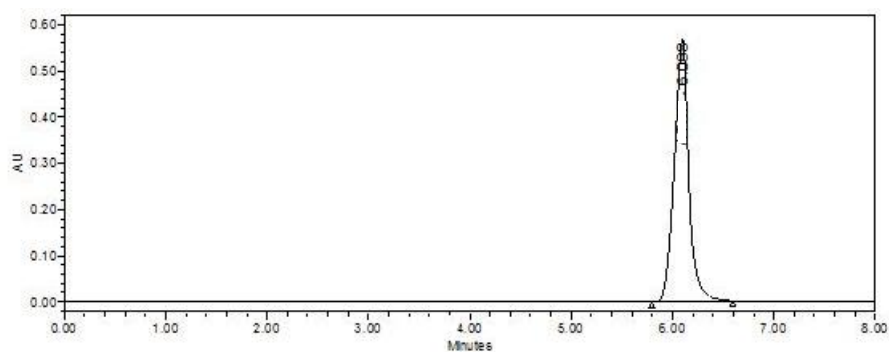


Figura C.4 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio de *suntest* a 12h

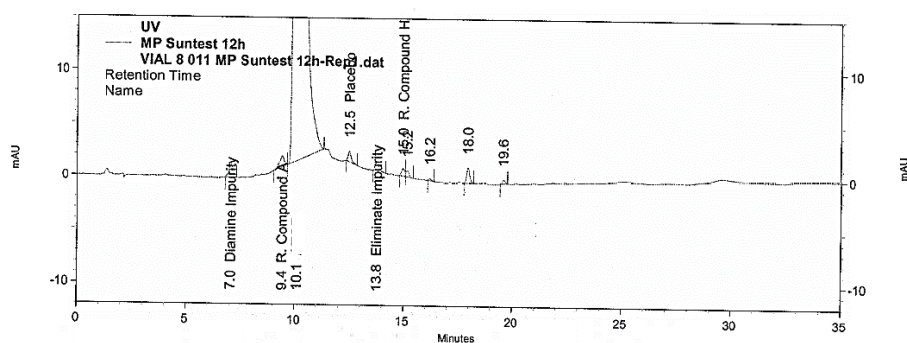


Figura C.5 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio de *suntest* a 12h

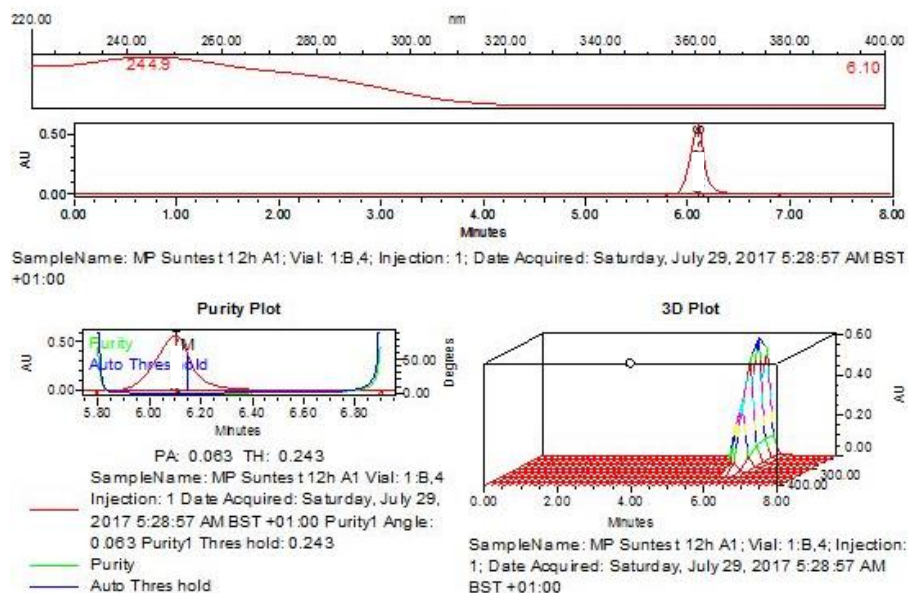


Figura C.6 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza de matéria prima do ensaio de *suntest* a 12h

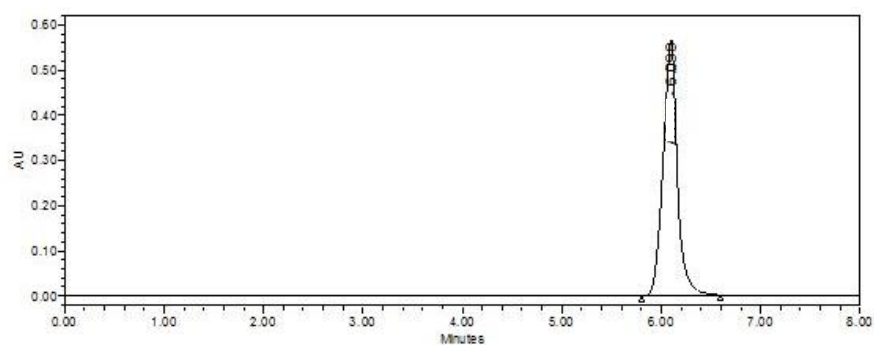


Figura C.7 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do *ensaio* de suntest a 24h

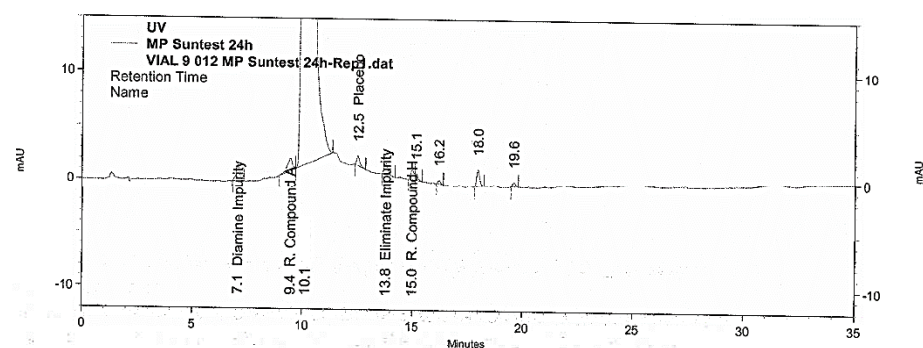


Figura C.8 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do *ensaio* de suntest a 24h

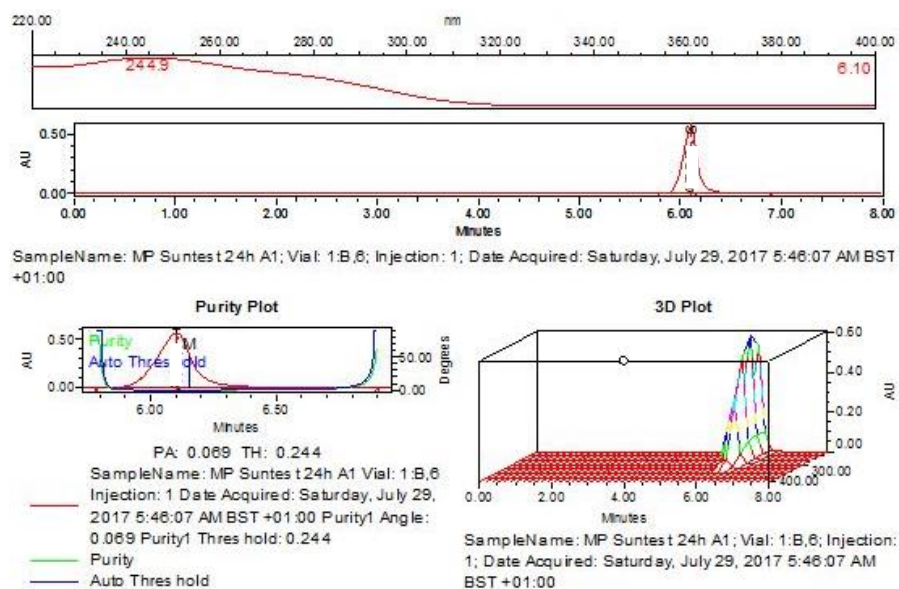


Figura C.9 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza de matéria prima do *ensaio* de suntest a 24h

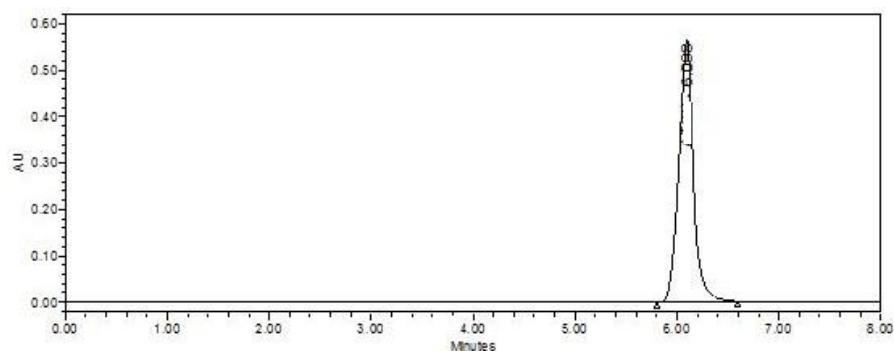


Figura C.10 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio de *suntest* a 48h

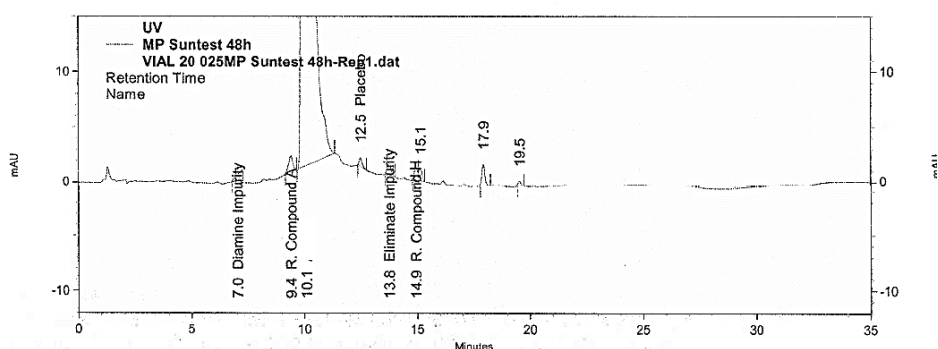


Figura C.11 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio de *suntest* a 48h

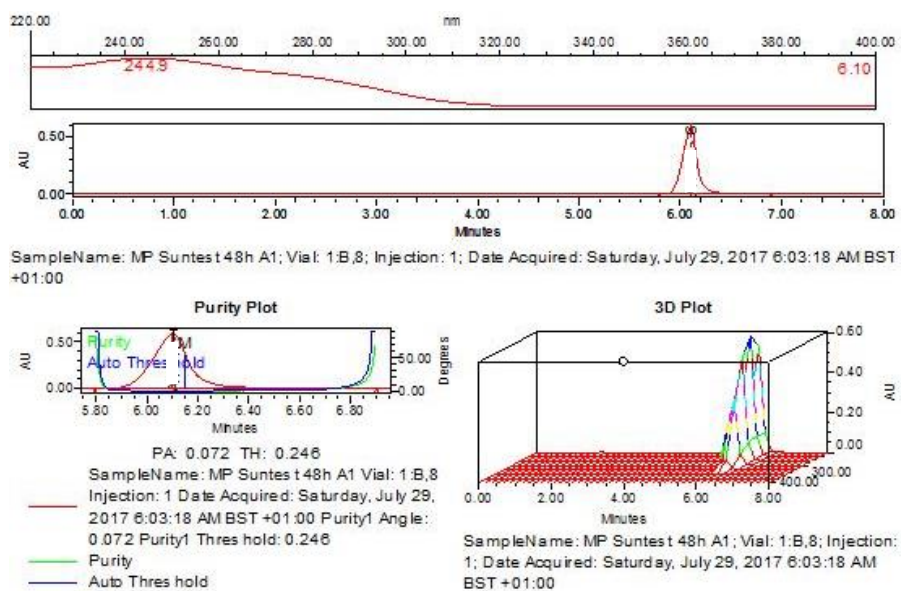


Figura C.12 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza de matéria prima do ensaio de *suntest* a 48h

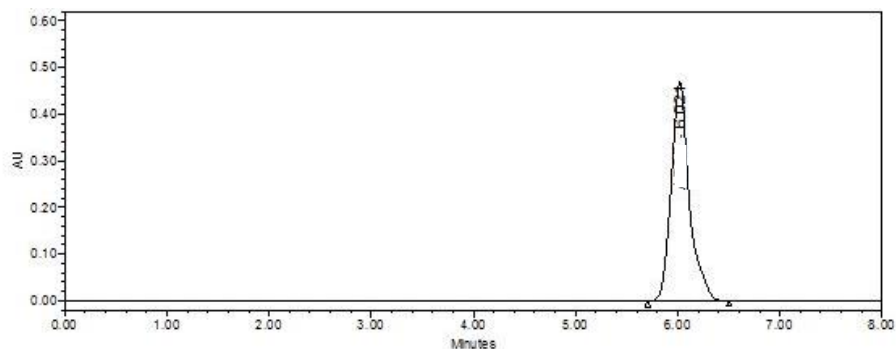


Figura C.13 -Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio a 50°C durante 3 dias

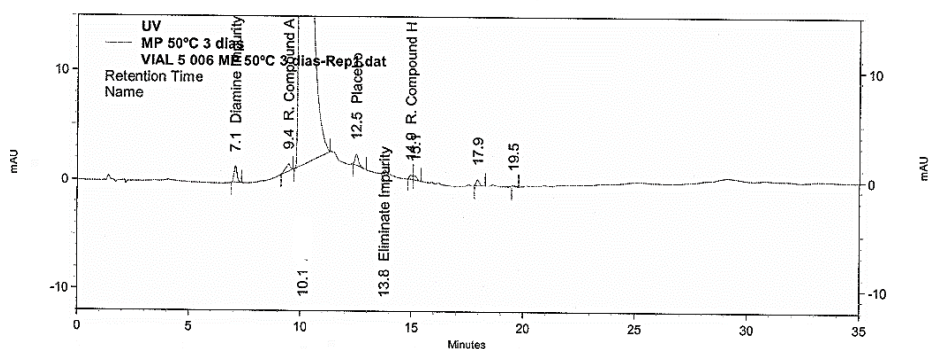


Figura C.14 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio a 50°C durante 3 dias

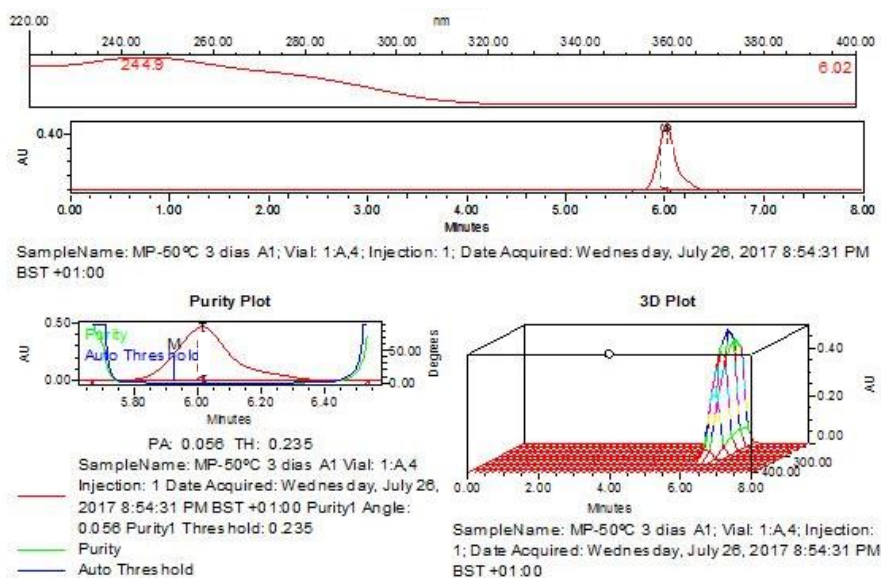


Figura C.15 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza de matéria prima do ensaio a 50°C durante 3 dias

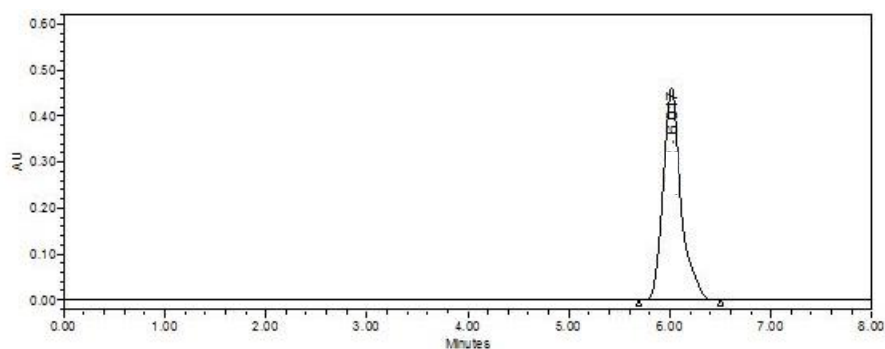


Figura C.16 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio a 50°C durante 7 dias

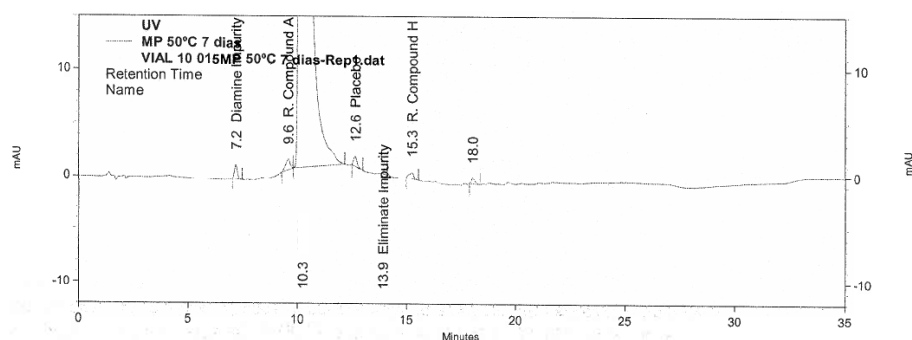


Figura C.17 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio a 50°C durante 7 dias

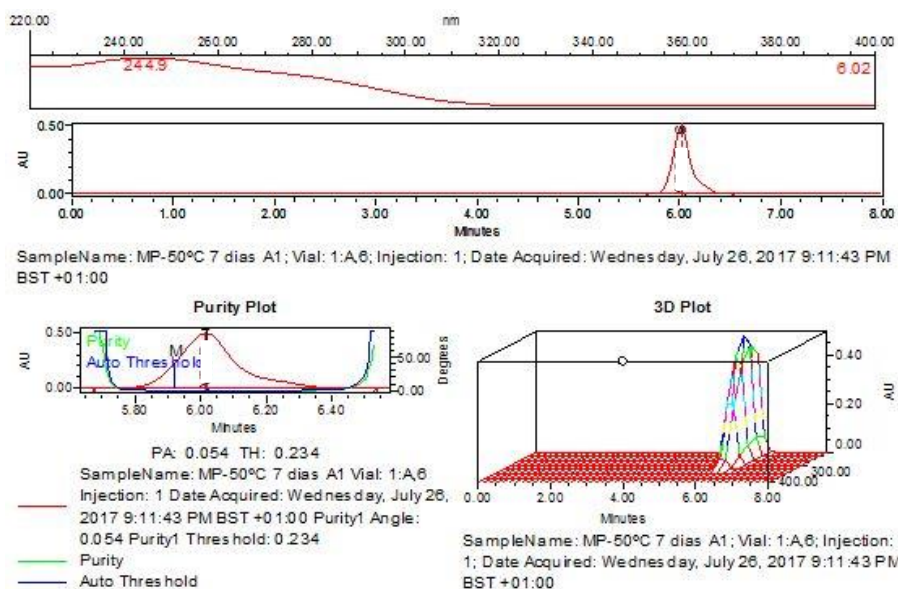


Figura C.18 - Espetro de absorvância e gráfico de pureza de matéria prima do ensaio a 50°C durante 7 dias

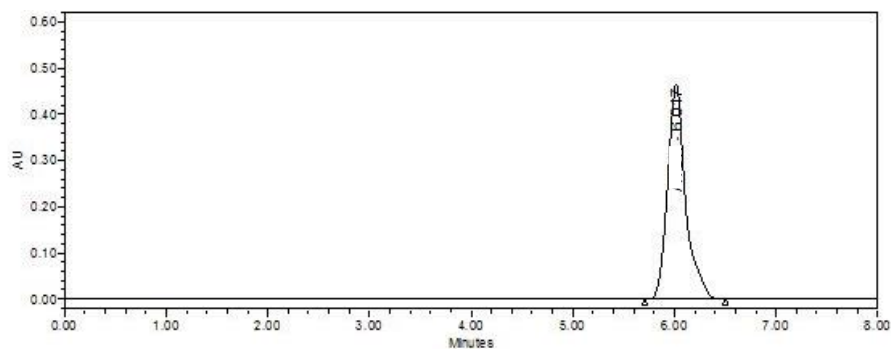


Figura C.19 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio a 90°C durante 3 dias

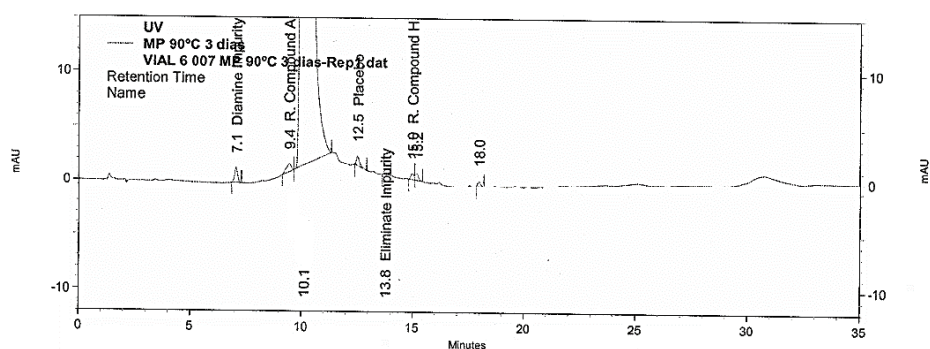


Figura C.20 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio a 90°C durante 3 dias

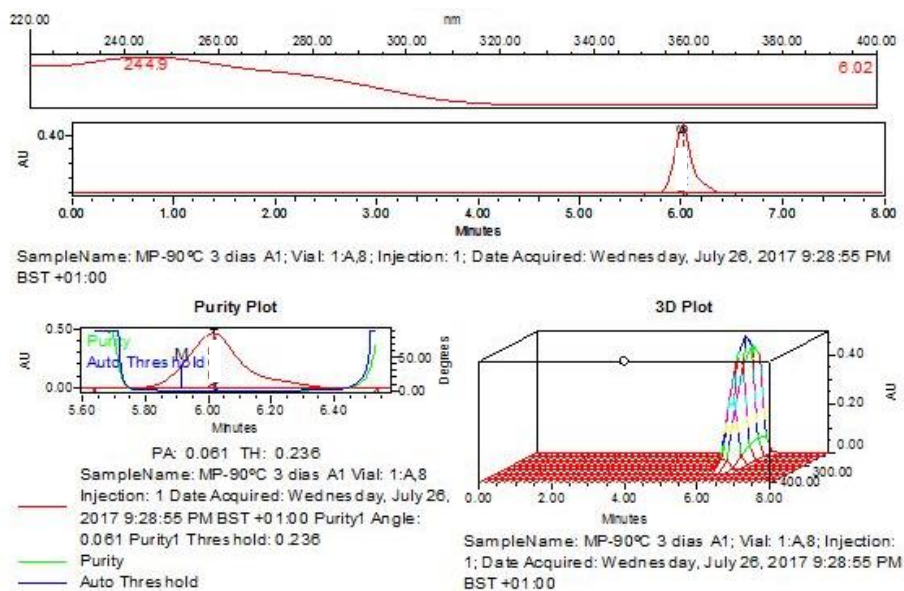


Figura C.21 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza de matéria prima do ensaio a 90°C durante 3 dias

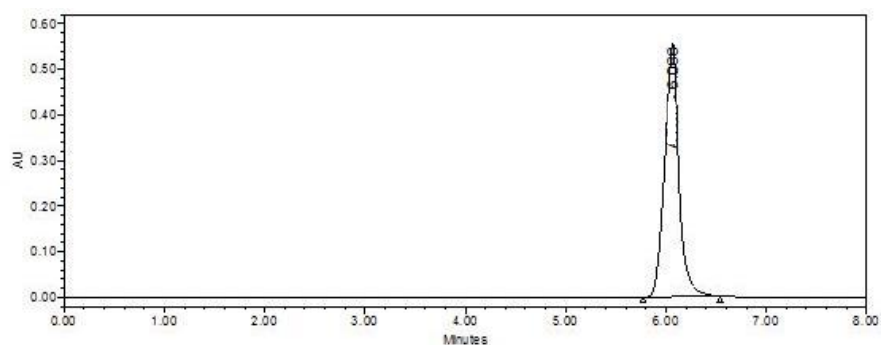


Figura C.22 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio a 90°C durante 7 dias

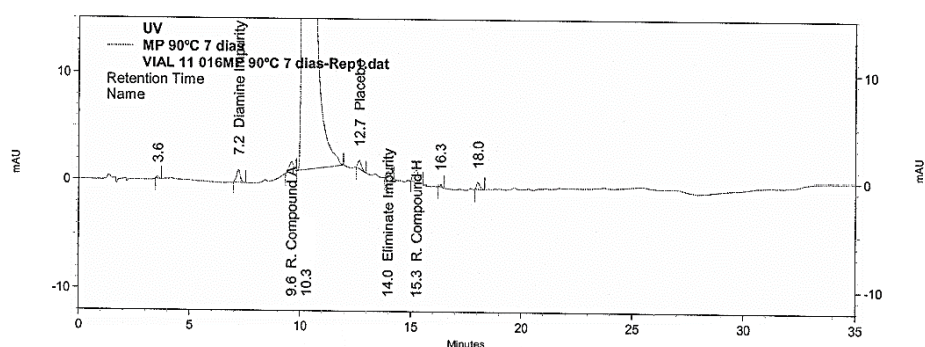


Figura C.23 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio a 90°C durante 7 dias

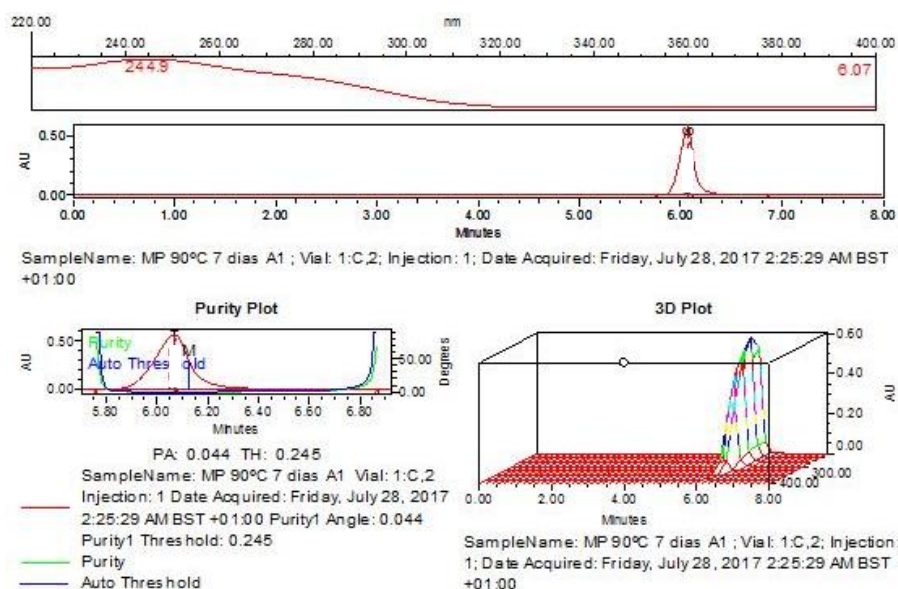


Figura C.24 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza de matéria prima do ensaio a 90°C durante 7 dias

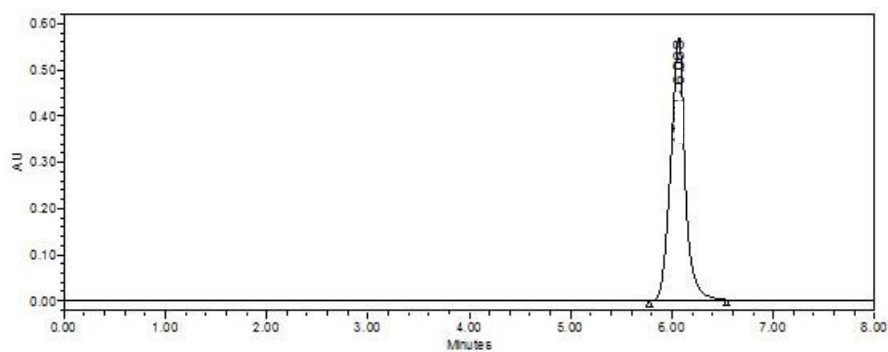


Figura C.25 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio a 85%HR durante 3 dias

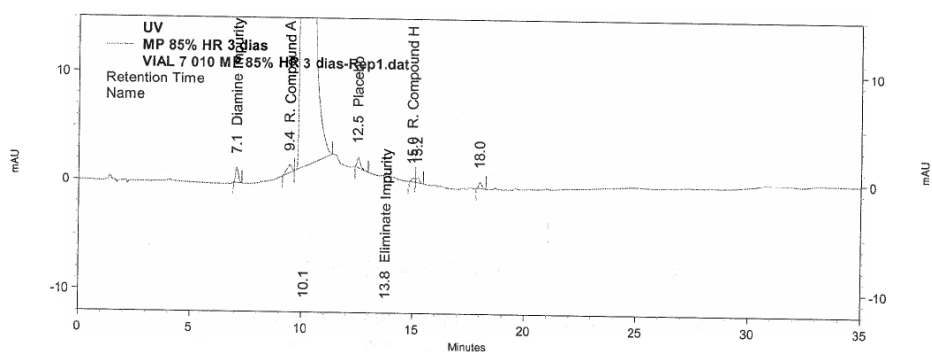


Figura C.26 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio a 85%HR durante 3 dias

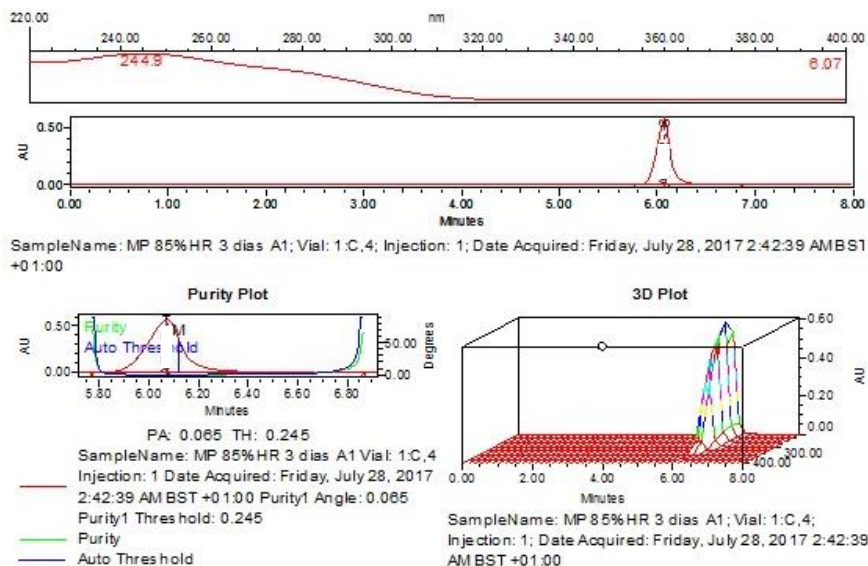


Figura C.27 - Espetro de absorvância e gráfico de pureza de matéria prima do ensaio a 85%HR durante 3 dias

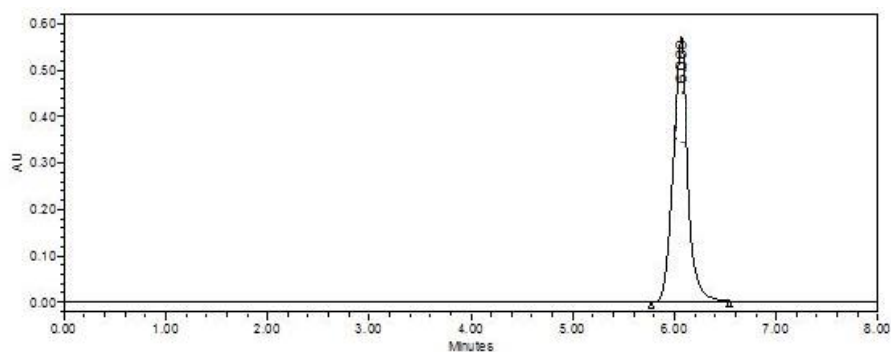


Figura C.28 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio a 85%HR durante 7 dias

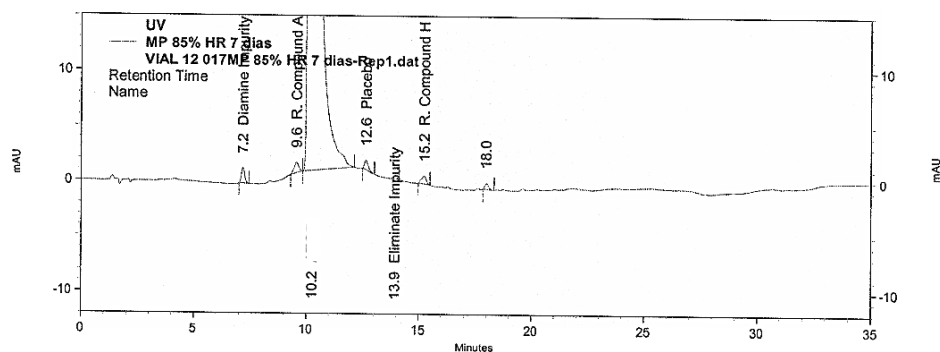


Figura C.29 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio a 85%HR durante 7 dias

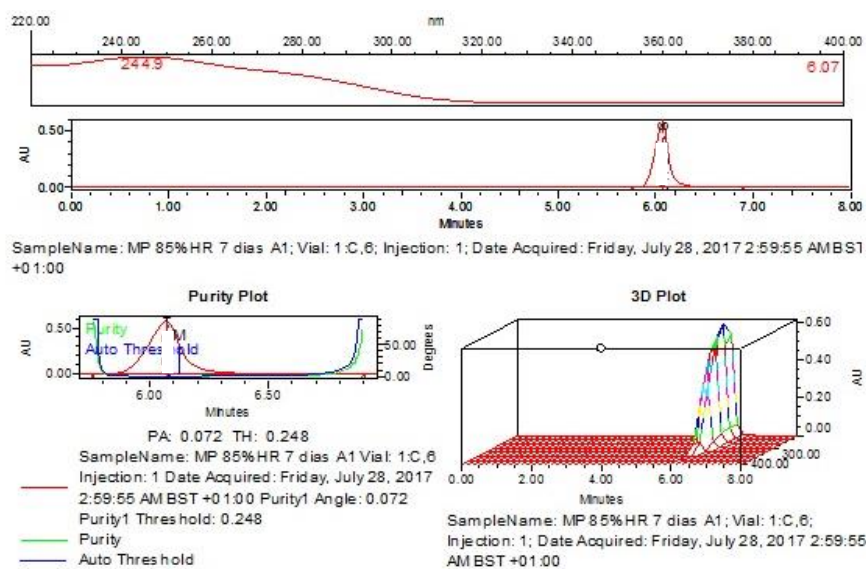


Figura C.30 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza de matéria prima do ensaio a 85%HR durante 7 dias

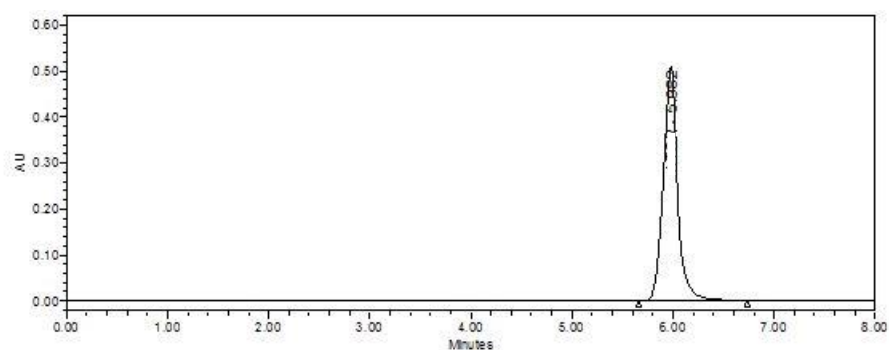


Figura C.31 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio com meio ácido (HCl 0.05N) às 3h

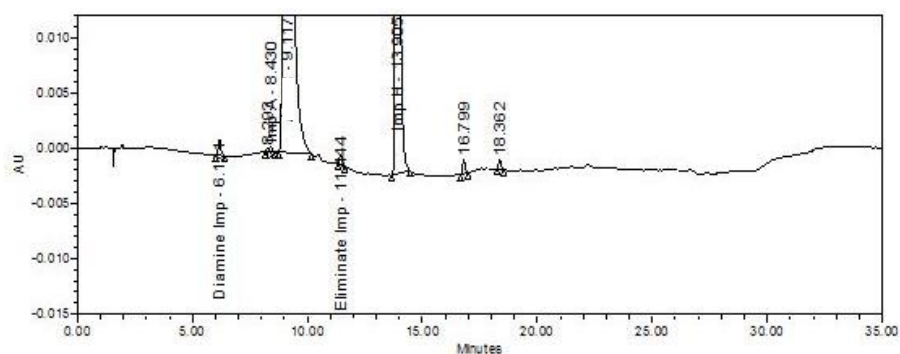


Figura C.32 - Cromatograma do sistema de CR da matéria prima do ensaio com meio ácido (HCl 0.05N) às 3h

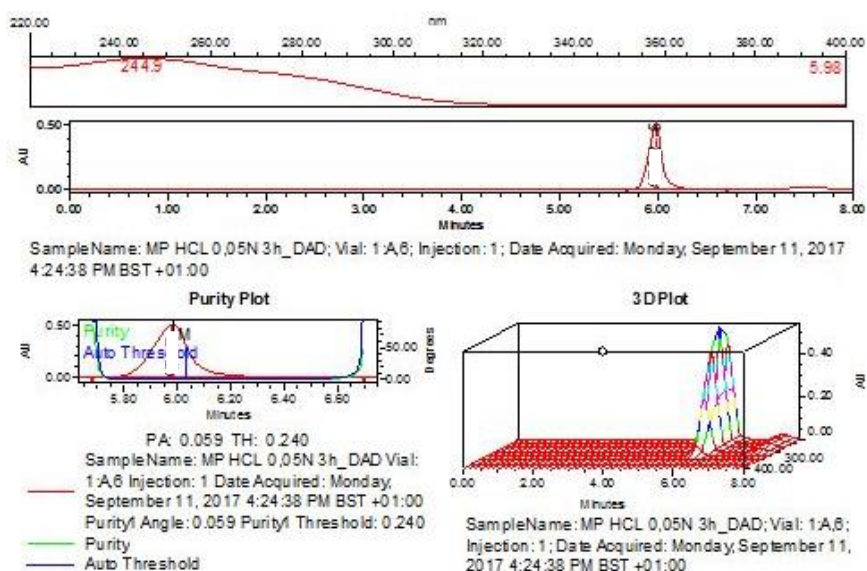


Figura C.33 - Espetro de absorvância e gráfico de pureza da matéria prima do ensaio com meio ácido (HCl 0.05N) às 3h

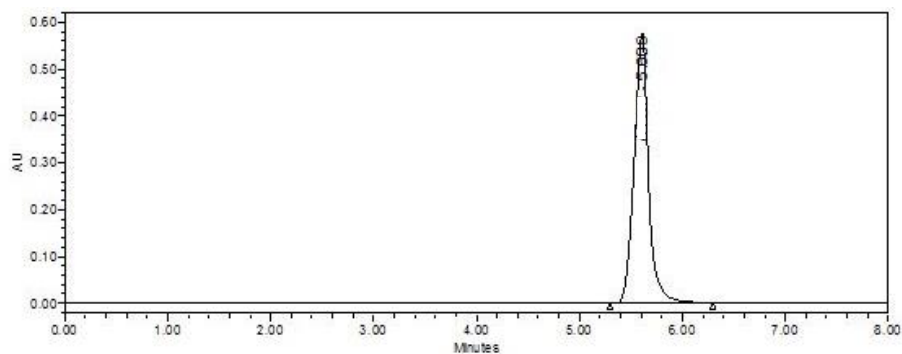


Figura C.34 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio com meio básico (NaOH 0.1N) às 3h

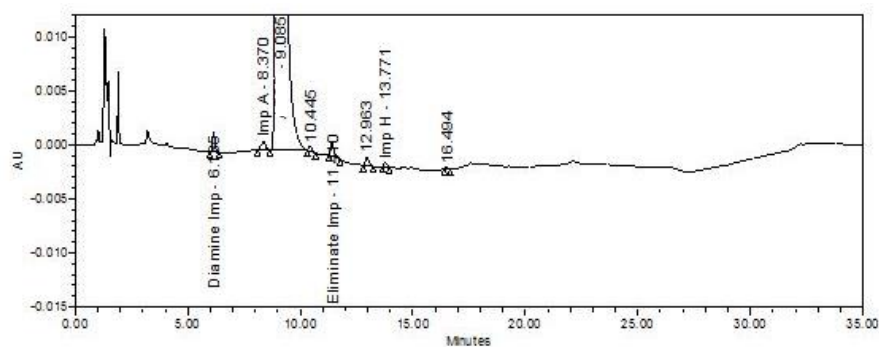


Figura C.35 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio com meio básico (NaOH 0.1N) às 3h

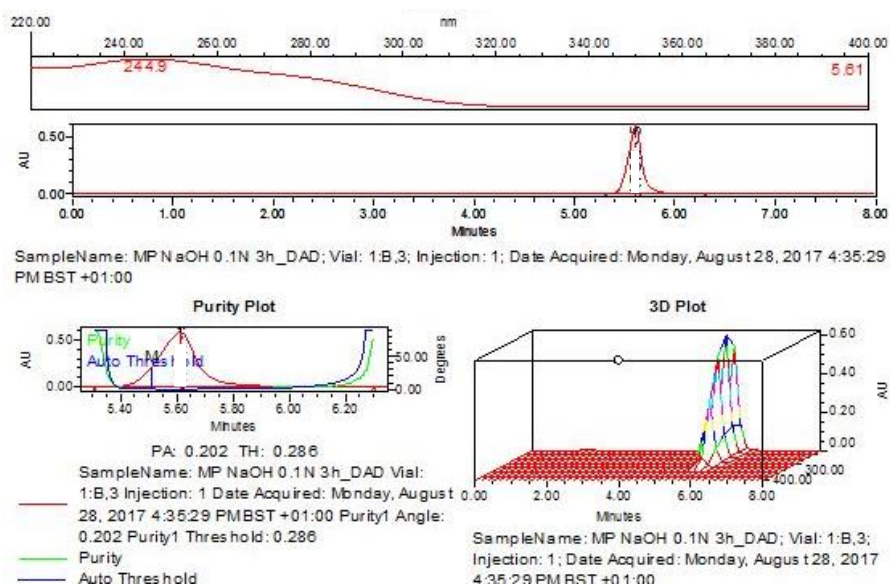


Figura C.36 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza da matéria prima do ensaio com meio básico (NaOH 0.1N) às 3h

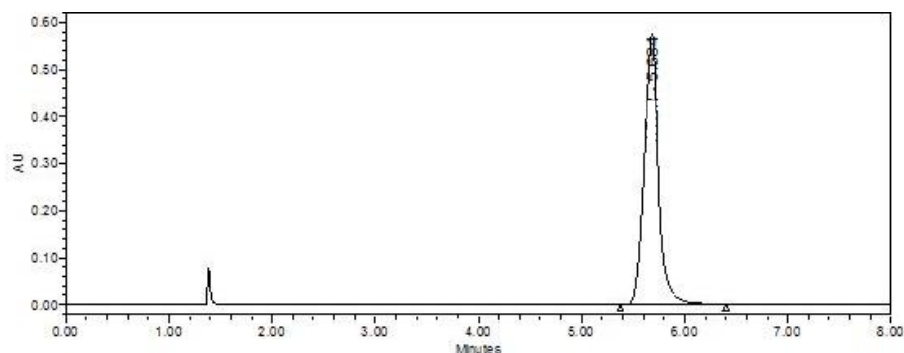


Figura C.37 - Cromatograma do sistema de doseamento de matéria prima do ensaio com meio oxidativo (H_2O_2 0.6%) às 3h

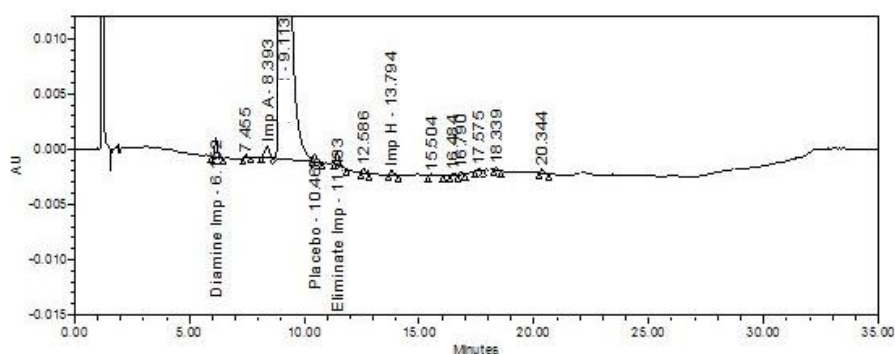


Figura C.38 - Cromatograma do sistema de CR de matéria prima do ensaio com meio oxidativo (H_2O_2 0.6%) às 3h

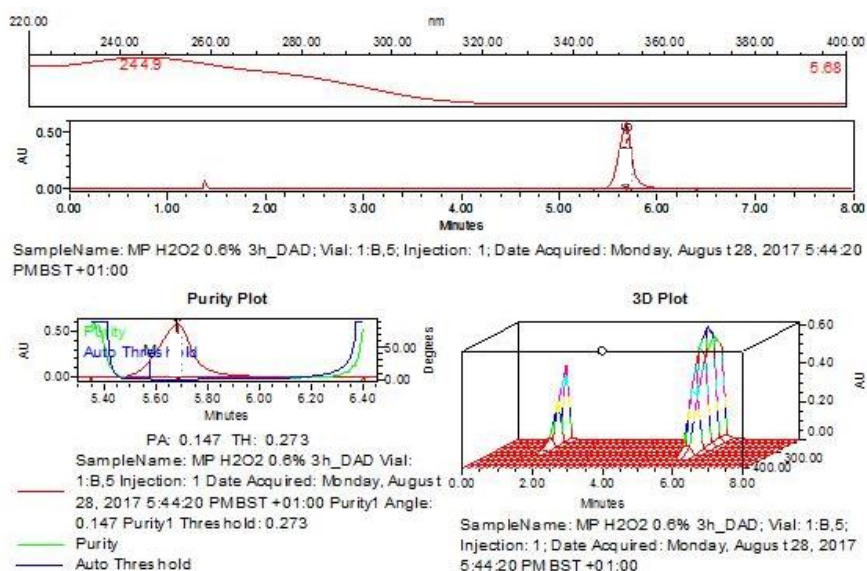


Figura C.39 - Espectro de absorvância e gráfico de pureza da matéria prima do ensaio com meio oxidativo (H_2O_2 0.6%) às 3h